

AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A TESTES DE TOXICIDADE DE DOSES REPETIDAS COM O FÁRMACO AQ1+2 (HB-RHP)

Júlia Tonello de Carvalho (IC) e Jan Carlo DeLorenzi (Orientador)

Apoio: PIBIC Mackenzie

Resumo

As bactérias são organismos unicelulares sem núcleo individualizado e com uma organização organelar bastante simples. A grande maioria é de vida livre, outras fazem parte da microbiota normal de um indivíduo e apenas uma pequena parte das bactérias causam processos infecciosos que debilitam o hospedeiro podendo-o levar ao óbito. A descoberta e utilização de fármacos antimicrobianos foram decisivas para a diminuição da mortalidade e morbidade das doenças causadas por bactérias. Avaliar a atividade antimicrobiana de fármacos especificamente desenhado para esse fim é o objetivo primeiro do presente trabalho. Partindo-se de um estudo preliminar de modelagem molecular foram sintetizados derivados nitrados do aldeído salicílico obtendo-se dois isômeros de posição, HB-AM1 e HB-AM2 e a sua mistura de isômeros HB-HRP. A histologia é uma das etapas da pesquisa que permite diagnosticar possíveis alterações e toxicidade induzida pelas moléculas em tecidos dos animais tratados. Tais alterações são visualizadas através da observação microscópica, possibilitando saber se o fármaco está pronto para ser registrado como medicamento segundo os padrões regulatórios. O objetivo do presente estudo é fazer a análise histopatológica aprofundada dos efeitos toxicológicos da substância HB-HRP em camundongos machos tratados cronicamente em diferentes concentrações, por 30 dias, atendendo as normativas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Palavras-chave: Histologia, antimicrobiano, aldeído salicílico

Abstract

Bacteria are single-celled organisms without individualized nucleus and with a quite simple organelle organization. The vast majority are free-living, others are part of the normal microbiota and only a small portion of the bacteria cause infectious processes that weaken the host it can lead to death. The discovery and use of antimicrobial drugs were crucial to reducing the mortality and morbidity of diseases caused by bacteria. The evaluation of the antimicrobial activity of drugs specifically designed for this purpose was the first objective of a huge project carried out by our laboratory since 2014. Starting from a preliminary study of molecular modeling were synthesized nitrated derivatives of salicylaldehyde to yield two positional isomers, HB-HB-AM1 and AM2 and its mixture of isomers HB-HRP. Histology is one of the stages of research that allows the diagnose of possible toxicity induced by molecules in tissues

of treated animals. Such changes are visualized by microscopic observation, making it possible to know if the drug is ready to be registered as a medicine according to regulatory standards. The aim of this study is to make a thorough histopathologic analysis of the toxicological effects of HB-HRP substance in male mice chronically treated at different concentrations, for 30 days, meeting the regulations of the National Health Surveillance Agency (ANVISA). Our analysis revealed no significant alteration in organs and tissues studied, reinforcing previous data that the molecule is safe and valuable to further studies, including clinical ones.

Keywords: Histology, antimicrobial, salicylic aldehyde

INTRODUÇÃO

As bactérias são organismos unicelulares sem núcleo individualizado e com uma organização organelar bastante simples, classificados como seres procarióticos. Foram primeiramente identificadas por Antoine van Leeuwenhoek (aproximadamente nos anos de 1670), utilizando um microscópio rudimentar. A descoberta e utilização de fármacos antimicrobianos foram decisivas para a diminuição da mortalidade e morbidade das doenças causadas por bactérias. Contudo, a utilização indiscriminada permitiu o surgimento de cepas resistentes a alguns antibióticos ou ainda a uma multiplicidade deles. (MURRAY, 2006)

Cada antimicrobiano pode ser classificado quanto a sua atividade, bactericida ou bacteriostática. Bacteriostáticos são moléculas que inibem o crescimento dos microrganismos, por mecanismos que envolvem bloqueio de síntese proteica ou produção de energia, por exemplo, enquanto os bactericidas são moléculas que bloqueiam funções vitais do microrganismo levando à morte, pois bloqueiam a síntese de parede celular, a replicação celular, dentre outras funções dos microrganismos. Os antibióticos ainda podem ser classificados pelo seu espectro de atividade, que descreve quantos e quais microrganismos são susceptíveis àquela molécula (AMINOV, 2010).

O desenvolvimento de antibióticos tem sido considerado como uma das conquistas médicas mais importantes do século XX. Transformou o curso da saúde humana ao permitir que muitas infecções graves pudessem ser debeladas, salvando incontáveis vidas, incluindo aqueles com doenças como câncer ou diabetes, e as pessoas submetidas à cirurgia todos os quais são particularmente vulneráveis às infecções. Os antibióticos tornaram-se tão amplamente utilizado que eles são uma propriedade de médicos e pacientes. Frequentemente, eles são utilizados quando não são necessários. Infelizmente, isto acelerou o desenvolvimento de resistência por parte dos microrganismos (FUKUDA, 2015).

A pesquisa de novos fármacos ainda está baseada em modificações de moléculas antimicrobianas já existentes ou busca de substâncias cujos alvos celulares são os mesmos dos antibióticos largamente utilizados e passíveis de resistência. Um olhar diferenciado dos processos de síntese/triagem de antimicrobianos associado a novos alvos farmacológicos é imprescindível para o sucesso na luta contra as atuais demandas de saúde. Tais ações só serão efetivas quando envolver todos os seguimentos da sociedade, desde os pesquisadores da pesquisa básica, passando pela pesquisa clínica e o desenvolvimento farmacotécnico, além dos atores da saúde pública (AMINOV, 2015; AKOVA et al, 2015).

O uso equivocado de antibióticos acelerou o surgimento de cepas resistentes. Este fato, por si só, levou a uma demanda crescente por novas moléculas nas últimas décadas do século XX. Entretanto, ainda que a demanda fosse cada vez maior, a pesquisa de fármacos

antimicrobianos foi gradativamente abandonada. Dois fatores podem ser implicados: a) a exaustão do modelo de triagem de moléculas naturais aliadas às tentativas de triagem genômica e b) a decisão comercial dos grandes conglomerados farmacêuticos mundiais em reduzir a pesquisa para o desenvolvimento de antibióticos, considerando a baixa rentabilidade dessa classe de medicamentos, quando comparada à rentabilidade de fármacos para doenças crônicas como hipertensão e diabetes. Desde o início do século XXI nenhuma molécula nova foi introduzida no mercado de antibióticos (FERNANDES, 2006; FUKUDA, 2015).

A importância dos antibióticos não pode ser subestimada; os seres humanos são totalmente dependentes deles para o tratamento de doenças infecciosas, e eles nunca devem ser considerados meras commodities.

Dessa forma, o presente projeto se caracteriza por buscar alternativas seguras, eficazes e com custo reduzido de maneira a atuar no enfrentamento de infecções bacterianas causadas tanto por cepas Gram positivas quanto Gram negativas. Tais alternativas podem ser mecanismos para beneficiar uma parcela significativa da sociedade, que sofre com diferentes tipos de doenças causadas por microrganismos.

O objetivo geral é aprofundar a avaliação toxicológica realizada com o fármaco sintético nitrado derivado do aldeído salicílico. Especificamente fazer a análise histopatológica dos efeitos toxicológicos da substância HB-RHP em camundongos machos tratados cronicamente em diferentes concentrações, por 30 dias, atendendo as normativas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Cada tecido é formado por vários tipos de células características daquele tecido e por associações e arranjos particulares entre células e matriz celular. Estas associações são, geralmente, muito peculiares e facilitam o reconhecimento dos muitos subtipos de tecidos pelos pesquisadores. (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008)

O exame histopatológico é uma ferramenta muito utilizada na rotina médica, sendo crucial na determinação e diagnóstico de doenças. Este exame consiste no estudo dos órgãos e tecidos do animal macro e microscopicamente. Cada tecido é geralmente muito característico, o que facilita o reconhecimento de efeitos tóxicos causados pelo fármaco (MONTENEGRO & FRANCO, 2004, JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

REFERENCIAL TEÓRICO

Guimarães, Momesso e Puppa (2010) definem antibióticos como compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de fungos ou bactérias.

Podem ser classificados como bactericidas, quando causam a morte da bactéria, ou bacteriostáticos, quando promovem a inibição do crescimento microbiano.

A partir de 2000, poucos antibióticos foram introduzidos para a terapêutica antimicrobiana. Em 2001, apenas um antibiótico de origem sintética da classe das oxazolidinonas foi introduzido no mercado farmacêutico, a linezolida. Os programas de descoberta de antibióticos de fontes naturais têm sido retomados em algumas indústrias farmacêuticas, levando à aprovação do lipodepsipeptídeo natural daptomicina pelo FDA em 2003 (GUIMARÃES et al., 2010).

A resistência pode ser considerada um fenômeno ecológico que ocorre como resposta da bactéria frente ao amplo uso de antibióticos e sua presença no meio ambiente. As bactérias multiplicam-se rapidamente, sofrem mutação e são promíscuas, podendo trocar material genético entre linhagens de mesma espécie ou de espécies diferentes. São consideradas micro-organismos de alta capacidade de adaptação a diversos fatores, como a exposição a agentes químicos potentes (GUIMARÃES et al., 2010).

O surgimento dos antibióticos representou um grande avanço da medicina, a esperança e a possibilidade de curar problemas de saúde que levavam muitas pessoas à morte. Hoje os hospitais apresentam níveis complexos de atendimento à saúde, e a infecção hospitalar mostra-se como uma inadequação e um problema mundial de saúde (OLIVEIRA, 2006).

O grande problema é que em muitas, se não na maioria das vezes, eles são tomados sem real necessidade, sem indicação médica, em doses inadequadas e por tempo insuficiente ou prolongado demais. Esses fatores desencadeiam alterações genéticas nas bactérias causadoras de doenças e fazem com que estas desenvolvam mecanismos de resistência (OLIVEIRA, 2006).

Segundo Menegotto e Picoli (2007), a resistência de *Staphylococcus aureus* à Oxacilina é um dos maiores problemas clínicos e epidemiológicos em infecções nosocomiais (infecções adquiridas nos hospitais), tendo adquirido papel de destaque pela sua multirresistência aos antimicrobianos usualmente utilizados na terapêutica e por sua fácil disseminação intra-hospitalar.

Fontelles e Mantovani (2001) observaram que a administração de antibioticoterapia mostrou-se efetiva em reduzir o tempo médio de internação, quando da ocorrência de qualquer tipo de complicação infecciosa. Os resultados mostraram que nos pacientes que não receberam antibiótico e evoluíram com algum tipo de complicação pleuropulmonar, o tempo de internação foi, em média, 3.2 dias maior que nos demais.

Uma avaliação da utilização de antibióticos por profissionais de saúde e pela população na cidade de Toledo no Paraná, Brasil, relatou que 52,3% dos membros da população entrevistada disseram ter recebido indicação de antibióticos na farmácia e 57,5% de parentes, amigos e vizinhos; somente 47% dos entrevistados referiram realizar a antibioticoterapia completa; todos os médicos e 74,6% dos farmacêuticos em farmácias acreditam que a população não utiliza antibióticos de forma correta. Os dados obtidos evidenciam má utilização deste grupo de medicamentos (MAIER, Criatine. 2007).

As estratégias de combate à evolução da resistência bacteriana devem ser centradas nas pessoas, começando ao nível local, por caracterização da utilização dos antibióticos, vigilância epidemiológica da susceptibilidade bacteriana, elaboração de recomendações para boa prática clínica, além da sensibilização da população que utiliza os antibióticos (DIAS, 2010).

Há exemplos de bactérias suscetíveis a antibióticos como o *Streptococcus pneumoniae* que apresenta suscetibilidade reduzida à penicilina, às cefalosporinas de 3ª geração e aos macrolídeos. O *Enterococcus spp* possui suscetibilidade diminuída às aminopenicilinas, e à vancomicina, triplicou aproximadamente nos últimos 3 anos (MANAGEIRO, et al 2009).

A *Enterobacteriaceae* adquiriu suscetibilidade diminuída em relação a C3G e aos aminoglicosídeos. *Pseudomonas aeruginosa* reportou declínio a suscetibilidade aos antibióticos como as fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e amicacina (MANAGEIRO, et al 2009).

METODOLOGIA

Os tecidos utilizados no presente trabalho foram oriundos dos estudos de avaliação toxicológicas de doses repetidas caracterizando a continuação do estudo em doses repetidas.

Após o recebimento dos tecidos dos camundongos, conservados em etanol 70%, no laboratório de Histologia, realizou-se cortes alinhados em 6 tipos de tecidos, para facilitar a observação no microscópio. Os órgãos escolhidos foram rim, baço, fígado, pulmão, coração e cérebro.

No baço realizou-se corte longitudinal, no cérebro corte sagital, no coração corte transversal, no fígado corte sagital, no pulmão corte transversal e no rim corte longitudinal. O corte dos tecidos é essencial para obter inicialmente os cortes com os planos anatômicos necessários para análise.

Realizado o corte, foram armazenados em cassetes com sua respectiva identificação e concentração que foi submetido da droga, e encaminhados para o processamento. Cujo tecido fica aproximadamente 8 horas e passa pelas seguintes etapas:

- Desidratação: Como a parafina é um composto não miscível na água a primeira etapa da inclusão se dedica à retirada da água dos tecidos e a sua substituição por álcool. Álcool 95% por 30 minutos, álcool 95% por 30 minutos, álcool 100% por 30 minutos e álcool 100% por 30 minutos;
- Diafanização: O álcool presente nos tecidos é substituído por xilol. Essa substituição se deve ao fato de o xilol ser miscível tanto em álcool quanto em parafina. O xilol retira o álcool e não atrapalha na impregnação da parafina. Xilol + Álcool por 30 minutos, xilol I por 30 minutos, xilol II por 30 minutos e xilol III por 30 minutos;
- Impregnação: O xilol é substituído por paraplast, fundida entre 58-60°C. Paraplast I por 45 minutos e Paraplast II por 1h15 minutos.

Na etapa seguinte, realizou-se o emblocamento dos tecidos. O emblocamento é uma etapa simples, que consiste em tirar o excesso de paraplast dos tecidos e depois cobri-los com uma grande quantidade de paraplast. Esse excesso de paraplast ajuda a manter a firmeza do tecido na hora do corte, e como o tecido é colocado em formas de metal, o formato será especialmente feito para encaixe no micrótomo. Assim que o tecido é emblocado é necessário que esfrie, para que assim coloque no freezer e depois retirar o bloco de metal que o envolve.

Posteriormente foi necessário realizar o corte dos tecidos no micrótomo. Esta é a etapa mais importante e difícil da técnica histológica e consiste basicamente em obter cortes sucessivos dos blocos de parafina contendo fragmentos de órgãos. Estes cortes são obtidos graças ao uso do aparelho micrótomo que consta essencialmente de uma faca de aço especial muito bem afiada e um braço, ao qual se prende o bloco e que se desloca verticalmente para cima e para baixo. Realizou-se os cortes dos tecidos, que foram fixados em lâminas (limpadas com água destilada e álcool 70%) e posteriormente encaminhados para a estufa por 1 dia.

Quando os cortes de todos os tecidos nas diferentes concentrações do fármaco, foram obtidos realizou-se a coloração com o corante HE (hematoxilina-eosina), para que fosse possível a análise microscópica. Através da diferença e intensidades das cores, pode-se determinar se um fármaco é tóxico ou não para determinado tecido.

Utilizou-se 21 recipientes na passagem da lâmina com o tecido. Esta etapa é subdividida em 4 etapas, a diafanização, hidratação, coloração e desidratação. Na diafaização o tecido passa pelo primeiro recipiente com xilol por 15 minutos, depois pelo segundo recipiente com o mesmo xilol por 10 minutos e depois por outro recipiente contendo

o mesmo xilol por 10 minutos. Na hidratação passa por álcool 100%, álcool 95% por 5 minutos, álcool 80% por 5 minutos, álcool 70% por 5 minutos, álcool 50% por 5 minutos, água destilada por 5 minutos. Na coloração, hematoxilina por 20 minutos, diferenciador, passagem rápida, eosina por 5 minutos e água de torneira. Na desidratação e última etapa, o tecido é imerso em álcool 95% por 5 minutos, álcool 95% por 5 minutos, álcool 100% por 5 minutos, álcool 100% por 5 minutos, xilol - passagem rápida, outro recipiente com o mesmo xilol - passagem rápida e por fim as lâminas ficam no ultimo recipiente contendo xilol até finalizar a montagem de todas as lâminas juntamente com a lamínula.

Após todas as etapas, o tecido foi encaminhado para a análise no microscópico, para elaboração dos resultados.

RESULTADO E DISCUSSÃO

As Figuras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 evidenciam as avaliações histopatológicas realizadas nos tecidos dos animais tratados com doses repetidas. É possível observar que não há evidências de quaisquer alterações significativas que possam implicar em toxicidade dos animais.

Figura 1 - HISTOPATOLOGIA CONTROLE. A – BAÇO (Aumento: 100 X); B – CÉREBRO (Aumento: 100 X); C – CORAÇÃO (Aumento: 400 X); D – FÍGADO (Aumento: 400 X); E – PULMÃO (Aumento: 100 X); F – RIM (Aumento: 100 X).

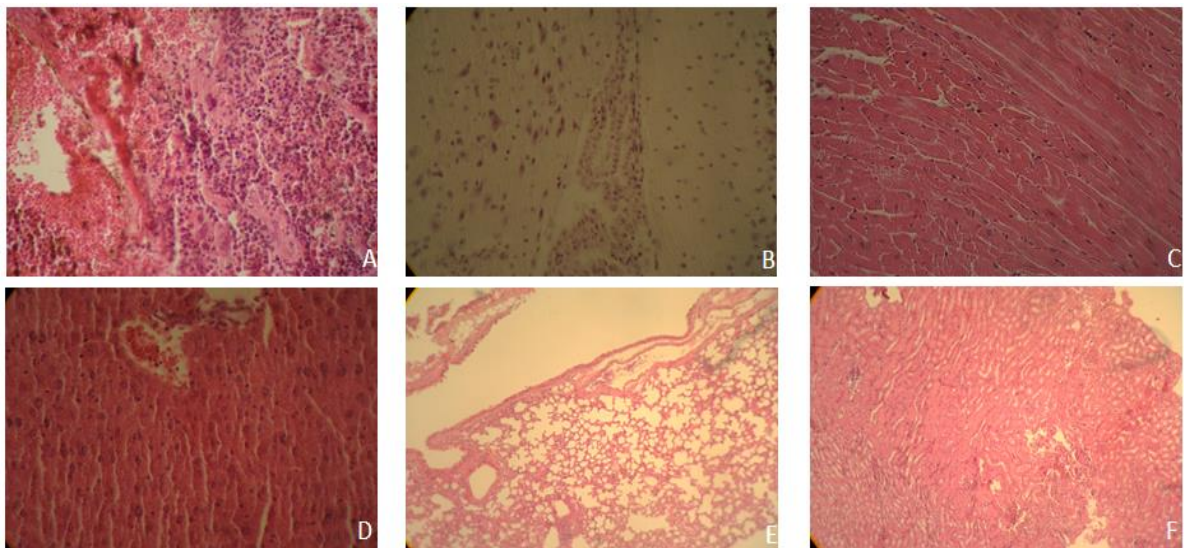


Figura 2 - HISTOPATOLOGIA DMSO 5%. A – BAÇO (Aumento: 100 X); B – CÉREBRO (Aumento: 100 X); C – CORAÇÃO (Aumento: 400 X); D – FÍGADO (Aumento: 400 X); E – RIM (Aumento: 100 X).

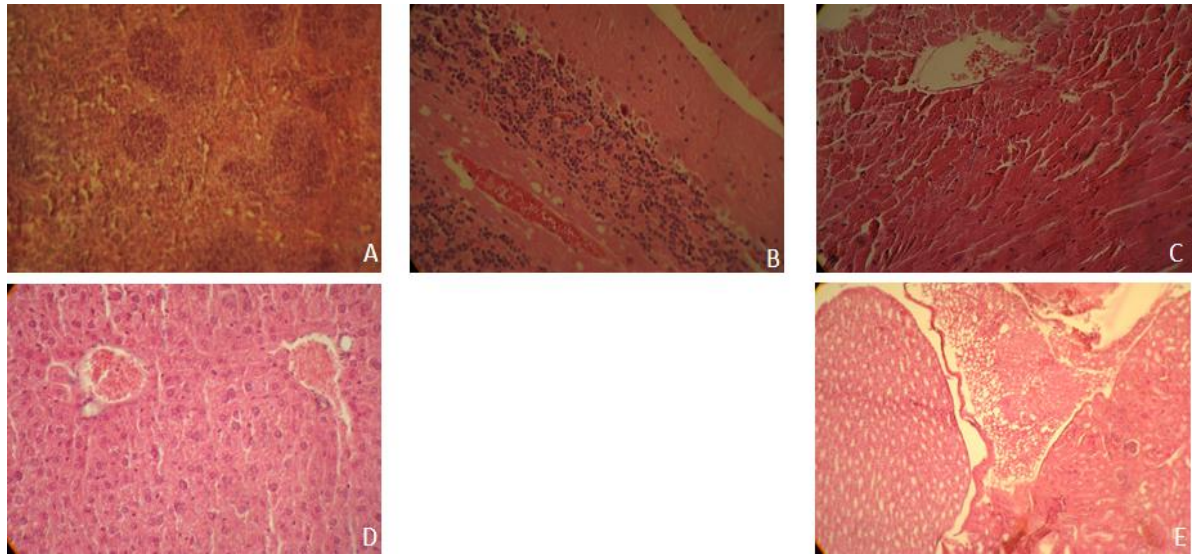


Figura 3 - HISTOPATOLOGIA AQ1+2 5 mg/Kg. A – BAÇO (Aumento: 100 X); B – CÉREBRO (Aumento: 100 X); C – CORAÇÃO (Aumento: 100 X); D – FÍGADO (Aumento: 400 X); E – PULMÃO (Aumento: 100 X); F – RIM (Aumento: 100 X).

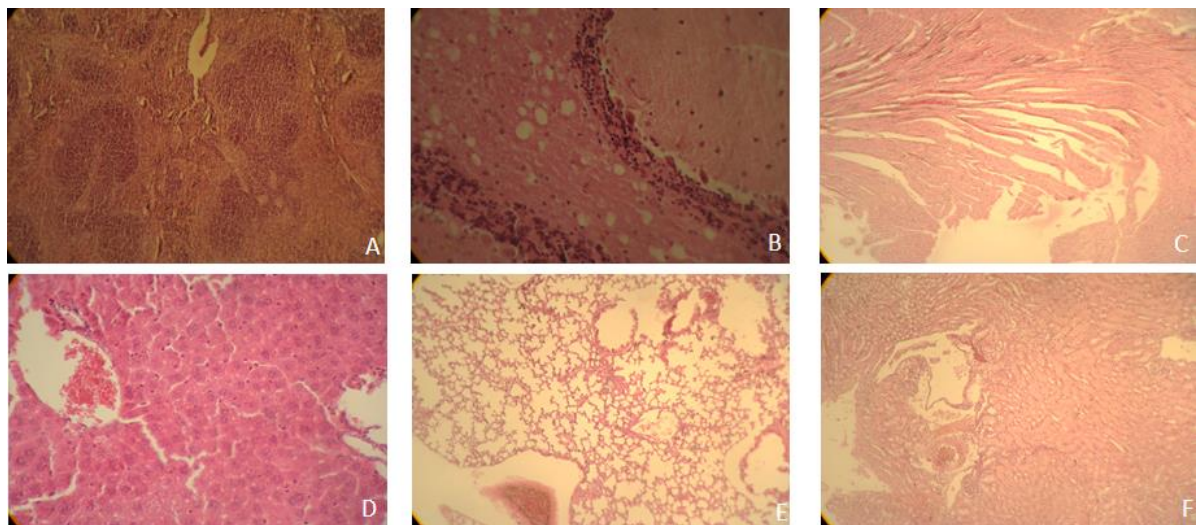


Figura 4 - HISTOPATOLOGIA AQ1+2 10 mg/Kg. A – BAÇO (Aumento: 100 X); B – CÉREBRO (Aumento: 100 X); C – CORAÇÃO (Aumento: 400 X); D – FÍGADO (Aumento: 400 X); E – PULMÃO (Aumento: 100 X); F – RIM (Aumento: 100 X).

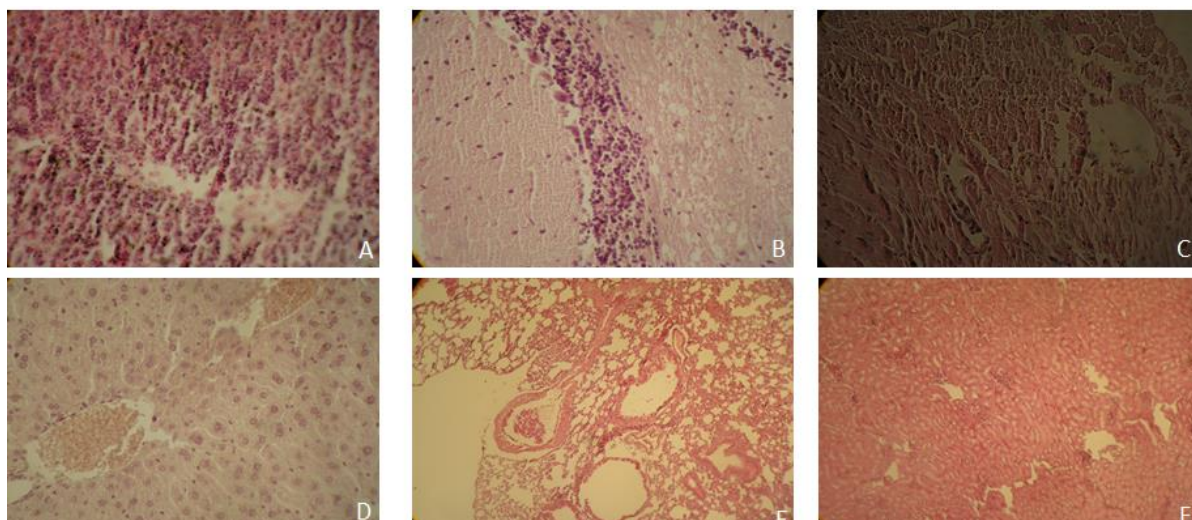


Figura 5 - HISTOPATOLOGIA AQ1+2 50 mg/Kg. A – BAÇO (Aumento: 100 X); B – CÉREBRO (Aumento: 100 X); C – CORAÇÃO (Aumento: 400 X); D – FÍGADO (Aumento: 400 X); E – PULMÃO (Aumento: 400 X); F – RIM (Aumento: 100 X).

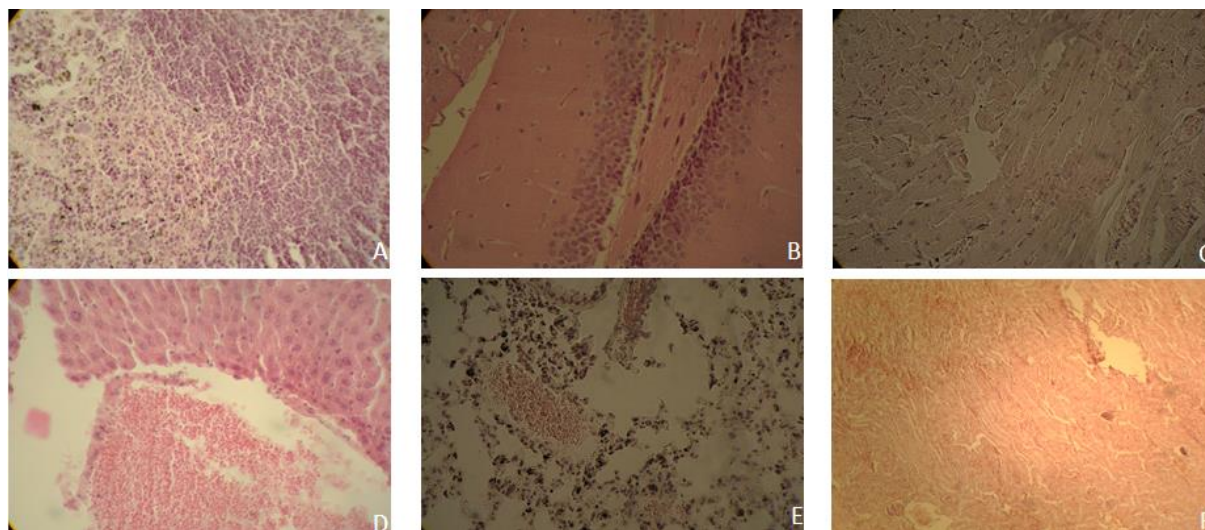


Figura 6 - HISTOPATOLOGIA CONTROLE. A – BAÇO (Aumento: 100 X); B – CÉREBRO (Aumento: 100 X); C – CORAÇÃO (Aumento: 400 X); D – FÍGADO (Aumento: 400 X); E – PULMÃO (Aumento: 100 X); F – RIM (Aumento: 100 X). F: Grande quantidade de gordura.

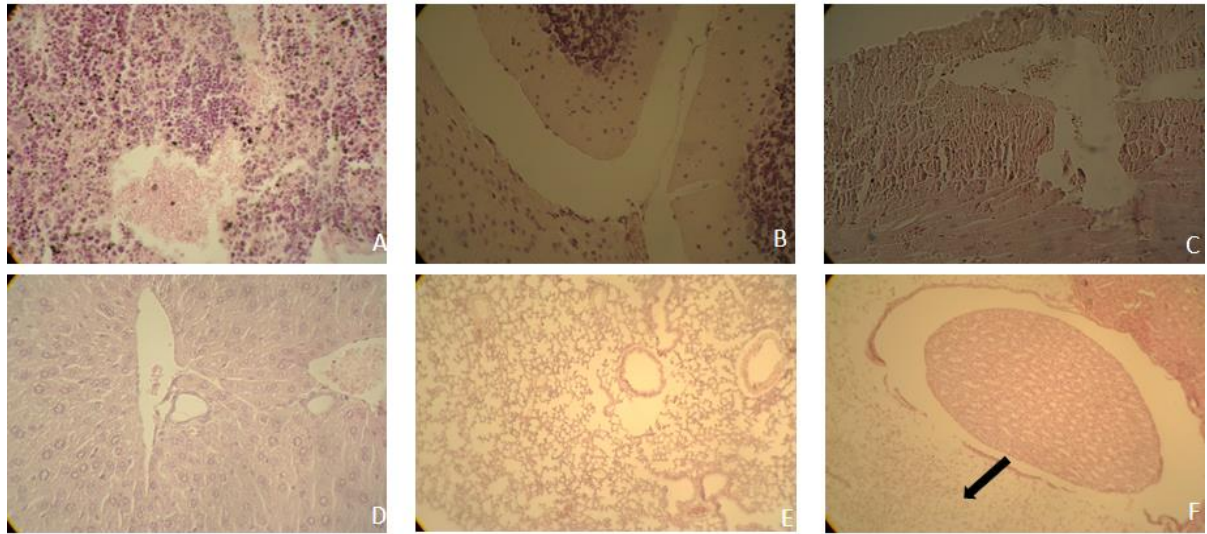


Figura 7 - HISTOPATOLOGIA DMSO 5%. A – BAÇO (Aumento: 100 X); B – CÉREBRO (Aumento: 100 X); C – CORAÇÃO (Aumento: 400 X); D – FÍGADO (Aumento: 400 X); E – PULMÃO (Aumento: 100 X); F – RIM (Aumento: 100 X). F: Grande quantidade de gordura.

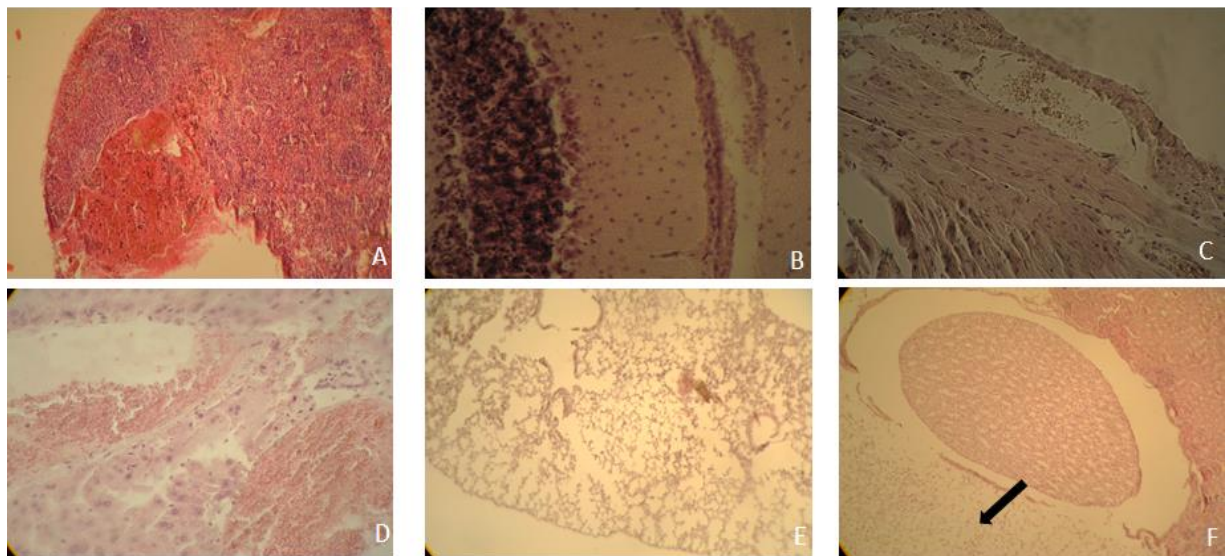


Figura 8 - HISTOPATOLOGIA AQ1+2 5 mg/Kg. A – BAÇO (Aumento: 100 X); B – CÉREBRO (Aumento: 100 X); C – CORAÇÃO (Aumento: 400 X); D – FÍGADO (Aumento: 400 X); E – PULMÃO (Aumento: 100 X); F – RIM (Aumento: 100 X). F: Grande quantidade de gordura.

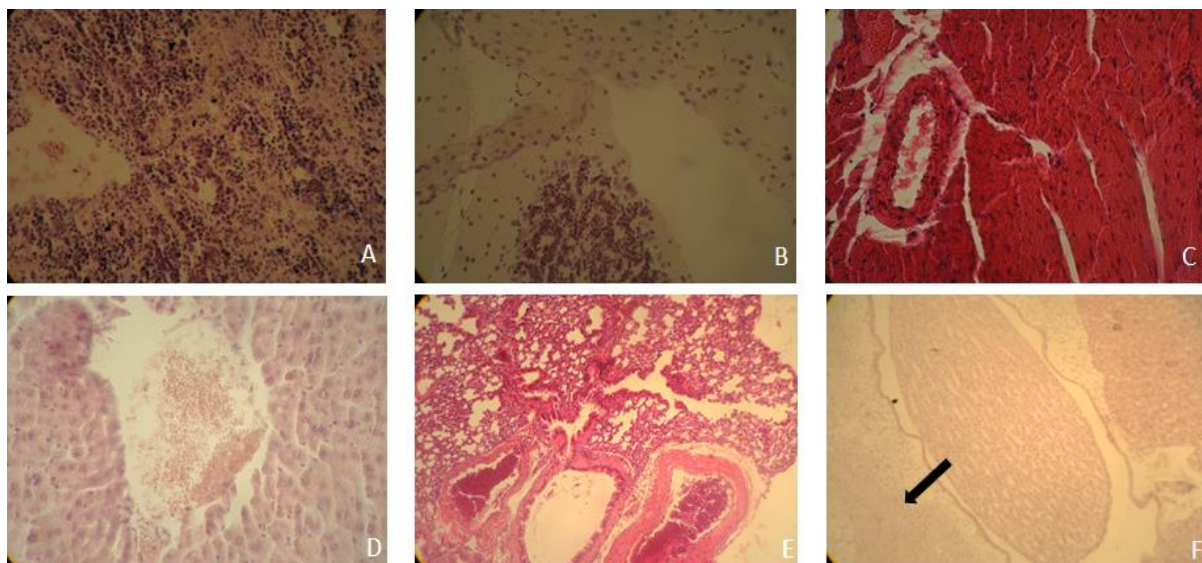


Figura 9 - HISTOPATOLOGIA AQ1+2 10 mg/Kg. A – BAÇO (Aumento: 100 X); B – CÉREBRO (Aumento: 100 X); C – CORAÇÃO (Aumento: 400 X); D – FÍGADO (Aumento: 400 X); E – PULMÃO (Aumento: 100 X); F – RIM (Aumento: 40 X). E: Grande quantidade de massa amorfa cor de rosa entre os alvéolos.

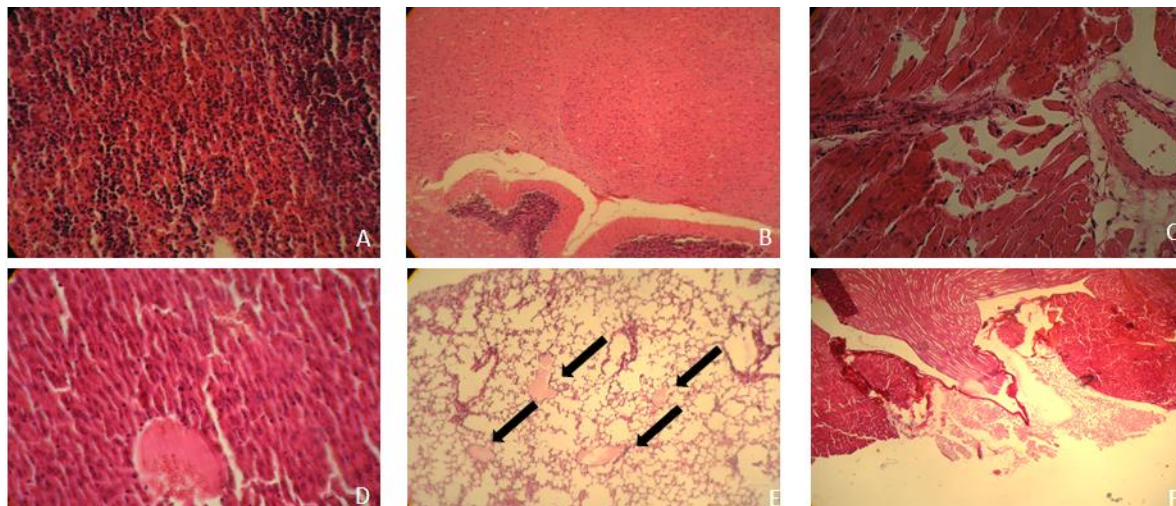
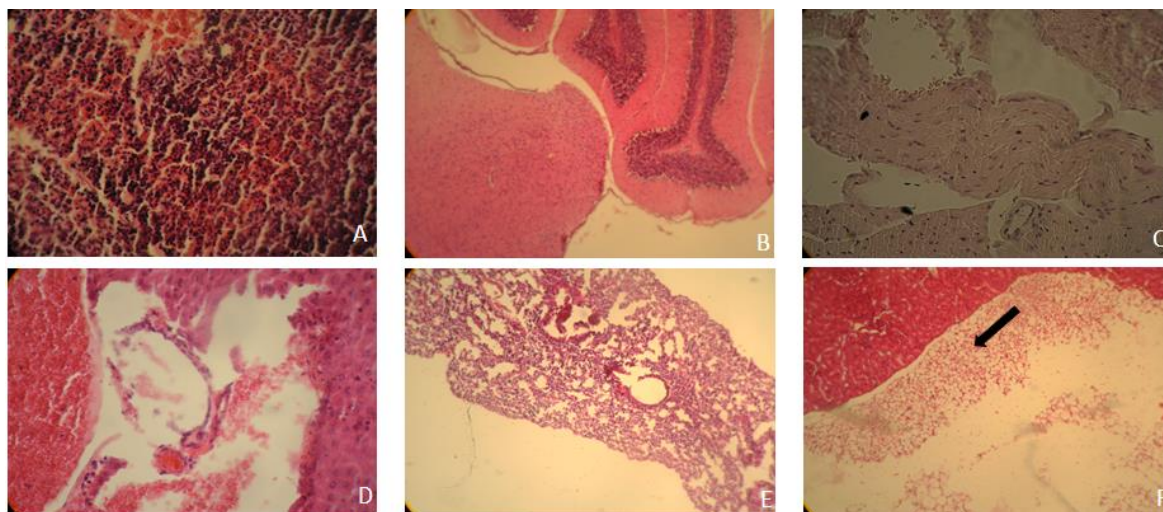


Figura 10 - HISTOPATOLOGIA AQ1+2 50 mg/Kg. A – BAÇO (Aumento: 100 X); B – CÉREBRO (Aumento: 100 X); C – CORAÇÃO (Aumento: 400 X); D – FÍGADO (Aumento: 400 X); E – PULMÃO (Aumento: 100 X); F – RIM (Aumento: 100 X). F: Grande quantidade de gordura.



É importante destacar que o acúmulo de tecido gorduroso na região da Cápsula de Bowman, nos rins, não é considerado uma alteração típica do tratamento (seta preta nas Figuras 8F e 10F), considerando que os animais controles também evidenciaram o mesmo perfil de acúmulo gorduroso (seta preta nas Figuras 6F e 7F). O material amorfo evidenciado entre os alvéolos pulmonares na Figura 9E está sob investigação. Possivelmente não está relacionado com o tratamento uma vez que em doses cinco vezes maiores (50mg/kg) tal inclusão não foi observada.

Isso posto, os dados conjuntos corroboram com a hipótese de que HB-RHP é um fármaco eficaz e seguro, permitindo o avanço para as outras fases do desenvolvimento medicamentoso.

Um estudo realizado na Universidade de Ciências Médicas de Shiraz com Rifampicina e Isoniazida (utilizados para o tratamento da tuberculose) mostrou que a Rifampicina pode causar hepatotoxicidade em ratos que utilizaram do medicamento, provocando lesão hepática com consequentes alterações histopatológica hepática. Já a Isoniazida aumentou a expressão de CYP2E1 hepática. Ambos os medicamentos, utilizados simultaneamente reduziram a expressão de CYP1A2 hepática. Além disso, esses medicamentos utilizados isoladamente ou em combinação provocaram alterações histopatológicas nos corações dos ratos, como também inchaço hepatocelular, vacuolização e degeneração gordurosa. (YONG, et al 2013)

Esses resultados são opostos aos efeitos que a substância HB-RHP causou nos camundongos. Ao contrário da Rifampicina, a HB-RHP não causou nenhuma alteração histopatológica nos fígados dos camundongos submetidos a doses repetidas da substância.

Como também não se observou alterações no coração e nenhuma degeneração gordurosa nos tecidos.

Outro estudo realizado pela Faculdade de Medicina da Universidade de Kentucky utilizou Doxorubicina (outro tipo de antibiótico) crônica induzida em ratos machos. A droga provocou efeitos histopatológicos não muito agradáveis, como hepatotoxicidade, apoptose das células e alterações de glutathione e dissulfureto de glutathione no coração. (ZHANG, et al 2015).

Entre essas e outras razões é que nota-se a eficácia da HB-HRP em todos os sentidos. No coração, as fibras cardíacas quando comparadas com o controle, não obtiveram diferença nenhuma, assim como a característica do tecido em geral. O cérebro que é um dos órgãos em que mais se preocupa o resultado, também não houve alterações, os neurônios foram mantidos normalmente tanto na lâmina de controle como nas demais lâminas com as outras dosagens.

O rim, essencial para a filtração do sangue, permaneceu sem evidências de alterações celulares, com quantidade de cápsula de Bowman adequada, foi notado o aparecimento de tecido adiposo que não é característico da droga, já que os animais controle já possuíam essa quantidade de gordura no rim.

O pulmão, fígado e baço também permaneceram sem alterações, com ausência de hepatotoxicidade (típica de alguns antibióticos).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Partindo da análise histopatológica, os resultados revelaram-se muito promissores no que se refere à atividade farmacológica dos fármacos derivados do aldeído salicílico. Embora sejam moléculas previamente descritas na literatura, os estudos de atividade antimicrobiana nunca foram realizados (mediante ao levantamento bibliográfico executado).

No tratamento de doses múltiplas por 28 dias tampouco foi evidenciado qualquer sinal de toxicidade, como foi observado nas imagens dos tecidos submetidos a determinadas concentrações do fármaco. Esses resultados reforçam que o fármaco apresenta segurança e eficácia para uso, sendo passível de submissão para estudos clínicos.

REFERÊNCIAS

- AMINOV, R.I. (2010). **A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future.** *Frontiers in Microbiology*. 1(134):1-7.
- AKOVA I.R., et al. (2015). **The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention.** *New Microbe and New Infect.* 6:22-29.
- DIAS, Margarida.; MONTEIRO, Micaela.; MENEZES, Maria.(2010) **ANTIBIÓTICOS E RESISTÊNCIA BACTERIANA, VELHAS QUESTÕES, NOVOS DESAFIOS.** Clínica Farmacológica. Circulo Médico.
- FERNANDES, P. (2006). **Antibacterial discovery and development--the failure of success?** *Nat. Biotechnol.* 24(12):1497-1503.
- FONTELLES, Mauro.; MANTOVANI, Mario.(2001). **Trauma torácico: importância da antibioticoterapia sobre o tempo de internação.** Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S01026502001000300004&lng=pt&nrm=iso
- FUKUDA, K. (2015). **Commentary: As the world stands on the edge of a post-antibiotic era, the time has come for decisive action.** Available in: <http://www.who.int/mediacentre/commentaries/antibiotic-resistance/en/>
- GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T.; **Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes.** Química Nova, 2010
- JUNQUEIRA, L.C.U. & CARNEIRO, J. **Histologia Básica.** 11^a Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 524p.
- MAIER, Criatiane.; ABEGG, Adriano. (2007) **Avaliação da utilização de antibióticos por profissionais de saúde e pela população na cidade de toledo, Paraná, Brasil.** Disponível em: <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=482705&indexSearch=ID>
- MANAGEIRO, Vera.; FERREIRA, Eugénia.; CANIÇA, Manuela. **Resultados laboratoriais da suscetibilidade aos antibióticos através dos participantes no EARS-Net em Portugal (2009-2011).** Disponível em: <http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/PublicacoesRepositorio/Documents/observa%C3%A7%C3%B5es%2020ARTIGO%206.pdf>
- MENEGOTTO, Fabíola.; PICOLI, Simone. **Staphylococcus aureus oxacilina resistente (MRSA): incidência de cepas adquiridas na comunidade (CA-MRSA) e importância da pesquisa e descolonização em hospital.** *RBAC*, vol. 39(2): 147-150, 2007
- MONTENEGRO, M. R. & FRANCO, M. **Patologia, processos gerais.** 4ed. São Paulo: Atheneu, 2004. P. 307-309
- MURRAY, P.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. (2006). **Microbiologia Médica.** Rio de Janeiro: Elsevier. 888 p.
- OLIVEIRA, Andrea. **Resistência Bacteriana A Antibióticos: Uma Análise Da Conduta Hospitalar.** *Revista Cesumar - Ciências Humanas e Sociais Aplicadas.* Jan./jun.2006, V. 11, nº 1, pp 59-69.

ZHANG, W.; DENG, J.; SUNKARA, M. MORRIS, A. WANG, C. CLAIR, D. VORE, M.(2015) **Loss of multidrug resistance-associated protein 1 potentiates chronic doxorubicin-induced cardiac dysfunction in mice.** PUBMED. Available in: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26354995>>

YONG, Lian. JING,Zhao. PEIYU, Xu. YIMEI, Wang, JUN, Zhao. LI, Jia. ZE, Fu. LI, Jing. GANG, Liu. SHUANGQING, Peng. (2013). **Protective Effects of Metallothionein on Isoniazid and Rifampicin-Induced Hepatotoxicity in Mice.** PMC. Available in: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3742471/>>

Contato: juliatcarvalho@hotmail.com e jan.bertassoni@mackenzie.br