



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA
DOUTORADO EM FARMACOLOGIA

TATIANA PASCHOALETTE RODRIGUES BACHUR

**INFLUÊNCIA DO SEXO SOBRE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS,
BIOQUÍMICOS E HISTOPATOLÓGICOS DE RATOS TRATADOS COM
AGOMELATINA ASSOCIADA A LOSARTANA, SINVASTATINA E
METFORMINA**

FORTALEZA

2020

TATIANA PASCHOALETTE RODRIGUES BACHUR

INFLUÊNCIA DO SEXO SOBRE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS
E HISTOPATOLÓGICOS DE RATOS TRATADOS COM AGOMELATINA ASSOCIADA
A LOSARTANA, SINVASTATINA E METFORMINA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Profa. Dra. Danielle Macêdo Gaspar

Coorientador: Prof. Dr. Gislei Frota Aragão

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- B118i Bachur, Tatiana Paschoalette Rodrigues.
Influência do sexo sobre parâmetros hematológicos, bioquímicos e histopatológicos de ratos tratados com agomelatina associada a losartana, sinvastatina e metformina / Tatiana Paschoalette Rodrigues Bachur. – 2020.
212 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2020.

Orientação: Profa. Dra. Danielle Macêdo Gaspar.

Coorientação: Prof. Dr. Gislei Frota Aragão.

1. Polifarmácia. 2. Agomelatina. 3. Losartana. 4. Sinvastatina. 5. Metformina. I. Título.

CDD 615.1

TATIANA PASCHOALETTE RODRIGUES BACHUR

INFLUÊNCIA DO SEXO SOBRE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS
E HISTOPATOLÓGICOS DE RATOS TRATADOS COM AGOMELATINA ASSOCIADA
A LOSARTANA, SINVASTATINA E METFORMINA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Profa. Dra. Danielle Macêdo Gaspar
Coorientador: Prof. Dr. Gislei Frota Aragão

Aprovada em: 16/04/2020.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Danielle Macêdo Gaspar (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Gislei Frota Aragão (Coorientador)
Universidade Estadual do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Janaína Serra Azul Monteiro Evangelista
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof. Dr. Cícero Francisco Bezerra Felipe
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Profa. Dra. Edna Maria Camelo Chaves
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

A Deus.

Aos meus pais, marido e filha.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Ceará, através do Programa de Pós-graduação em Farmacologia (PPGF), do Núcleo de Pesquisa Desenvolvimento de Medicamentos e Departamento de Fisiologia e Farmacologia, pela viabilização de todo o trabalho.

Ao coordenador do PPGF, Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães, pelo apoio, compreensão e suporte.

À minha orientadora, professora Dra. Danielle Macêdo Gaspar, por ter me acolhido de modo tão profissional, ético e sem preconceitos. E, mais ainda, pelo voto de confiança, pelo apoio e incentivo; por acreditar em mim, mesmo sabendo que era minha segunda chance. Serei sempre grata!

Ao meu coorientador, prof. Dr. Gislei Frota Aragão, por todo o companheirismo, amizade, apoio e orientação.

Aos professores titulares da banca examinadora, Profa. Dra. Janaína Serra Azul Monteiro Evangelista, Prof. Dr. Cícero Francisco Bezerra Felipe e Profa. Dra. Edna Maria Camelo Chaves, e suplentes Prof. Dr. José Eduardo Ribeiro Honório Junior Braga e Prof. Dr. Krishnamurti de Moraes Carvalho pela disponibilidade de tempo e dedicação na leitura desta tese, bem como pelas valiosas colaborações e sugestões.

À Poliana Barroso, sem a qual este trabalho não teria sido realizado, por toda a sua dedicação, empenho e parceria incondicional.

À professora Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves e ao Dr. Marcus Davis Machado Braga, pela realização das análises histopatológicas.

Aos técnicos Débora Rejane Alves Cavalcante, pelo processamento das lâminas, e Francisco Evanir Gonçalves Lima pelo processamento dos exames hematológicos e bioquímicos.

Ao meu marido Jorge pelo amor, compreensão, dedicação, suporte e apoio irrestritos.

A minha filha Mirela, por abrir mão do seu tempo de convivência comigo para que eu pudesse me dedicar a este trabalho.

Aos meus pais Tarcísio e Ivanete pelo incentivo sempre e pelas orações.

Às minhas irmãs, Aline e Flávia, e cunhados Marcos e Bruno, que sempre torcem pelo meu sucesso.

Aos meus amigos e amigas de infância sempre presentes acompanhando minhas lutas e conquistas – Vlândia, Rocaia, Tulia, Rebecca, Lorraine, Flávio, Paulo Roberto, Saulus, Carlos Frederico, Guilherme e outros tantos queridos.

Aos integrantes e ex-integrantes do Grupo de Estudos em Neuroinflamação e Neurotoxicologia da Universidade Estadual do Ceará– GENIT/UECE – por estarem sempre na torcida, incentivando e apoiando. Em especial a Luana Letícia, Carla Larissa, Daniel Girão e Juliana Ciarlini, que me auxiliaram em etapas importantes deste trabalho.

A Larissa Kelly pela imensa ajuda com a plotagem inicial dos milhões de dados.

Aos meus alunos da UECE, aos quais quero deixar a mensagem de que a resiliência é uma virtude a ser desenvolvida e que sempre é possível recomeçar.

Aos meus colegas professores do colegiado do curso de Medicina da UECE, pelo incentivo e torcida.

Aos colegas discente e aos professores do Programa de Pós-graduação em Farmacologia, pela convivência, pelos ensinamentos, pela paciência, pelas reflexões, críticas e sugestões recebidas.

A Deus – que me sustentou até aqui – toda honra e toda glória e agradecimento por toda a providência.

“Recomeça...
Se puderes
Sem angústia
E sem pressa.
E os passos que deres,
Nesse caminho duro
Do futuro
Dá-os em liberdade.
Enquanto não alcances
Não descanses.
De nenhum fruto queiras só metade.”

Miguel Torga

RESUMO

O conhecimento sobre o potencial dos fármacos em acarretar interações medicamentosas é essencial à segurança dos pacientes e eficácia dos tratamentos. Losartana, sinvastatina e metformina estão entre os fármacos para controle de doenças crônicas degenerativas mais utilizados mundialmente. Ao mesmo tempo, a agomelatina surge como recente alternativa terapêutica para depressão, com perfil de segurança relativamente melhor que outros antidepressivos, embora com potencial efeito hepatotóxico. O objetivo deste trabalho foi analisar o efeito da associação da agomelatina (AGO) com losartana (LOS), sinvastatina (SIN) e metformina (MET) sobre parâmetros hematológicos, bioquímicos e histopatológico de ratos *Wistar*, após tratamento subcrônico, e avaliar a interferência das associações no perfil antidepressivo da agomelatina. Ratos *Wistar* machos (60) e fêmeas(60) foram divididos em 10 grupos experimentais (n=6/grupo) e tratados *per os*, por 90 dias, com salina (controle), AGO (2,27mg/kg), LOS (4,61mg/kg), SIN (1,83mg/kg) e MET (78,66mg/kg) e suas combinações (AGO+LOS, AGO+SIN, AGO+MET, LOS+SIN+MET e AGO+ LOS+SIN + MET). Ao fim dos 90 dias de tratamento, os animais foram submetidos ao teste do nado forçado. Após a eutanásia, foram avaliados parâmetros hematológicos e bioquímicos e realizadas análises histopatológicas em múltiplos órgãos. Nas análises hematológicas, as principais alterações foram verificadas no eritrograma. Fêmeas foram mais sensíveis que machos ao uso concomitante de múltiplos fármacos em relação a alterações dos parâmetros hematológicos e bioquímicos. Os parâmetros bioquímicos relacionados às funções hepáticas e renal foram os mais afetados. A agomelatina foi relacionada ao aumento do risco de alterações histopatológicas em machos e fêmeas quando associada aos outros fármacos, especialmente no fígado, rins e baço. As fêmeas apresentaram alterações histopatológicas hepáticas mais intensas e mais severas quando a agomelatina foi associada a sinvastatina e metformina. Também as fêmeas foram mais sensíveis a alterações histopatológicas renais e a atrofia renal do que os machos quando em uso de metformina em monoterapia ou associada a agomelatina. O baço foi afetado de forma relevante, em particular nas fêmeas, em consonância com as alterações observadas no eritrograma. A atividade antidepressiva da agomelatina nos machos foi significativamente reduzida com o uso concomitante de metformina. O resultado do teste do nado forçado sinaliza a necessidade de investigação de potenciais interações da agomelatina e outros fármacos que podem culminar na diminuição da atividade antidepressiva da mesma.

Palavras-chave: Polifarmácia. Agomelatina. Losartana. Sinvastatina. Metformina.

ABSTRACT

SEX-RELATED INFLUENCE ON HEMATOLOGICAL, BIOCHEMICAL AND HISTOPATHOLOGICAL PARAMETERS OF RATS TREATED WITH LOSARTAN, SYNVASTATIN AND METFORMIN ASSOCIATED WITH AGOMELATIN

Knowledge about the potential of drugs to cause drug interactions is essential to patient safety and treatment efficacy. Losartan, simvastatin and metformin are among the most widely used drugs for the control of chronic degenerative diseases worldwide. At the same time, agomelatine appears as a recent therapeutic alternative for depression, with a relatively better safety profile than other antidepressants, although with a potential hepatotoxic effect. The objective of this study was to analyze the effect of the association of agomelatine (AGO) with losartan (LOS), simvastatin (SIN) and metformin (MET) on hematological, biochemical and histopathological parameters of Wistar rats, after subchronic treatment, and to evaluate the interference of associations in the antidepressant profile of agomelatine. Male (60) and female (60) Wistar rats were divided into 10 experimental groups (n = 6 / group) and treated per os, for 90 days, with saline (control), AGO (2.27mg / kg), LOS (4.61mg / kg), SIN (1.83mg / kg) and MET (78.66mg / kg) and their combinations (AGO + LOS, AGO + YES, AGO + MET, LOS + YES + MET and AGO + LOS + YES + MET). At the end of 90 days of treatment, the animals were subjected to the forced swim test. After euthanasia, hematological and biochemical parameters were evaluated and histopathological analyzes were performed on multiple organs. In hematological analyzes, the main changes were seen in the erythrogram. Females were more sensitive than males to the concomitant use of multiple drugs in relation to changes in hematological and biochemical parameters. Biochemical parameters related to liver and kidney function were the most affected. Agomelatine was related to an increased risk of histopathological changes in males and females when associated with other drugs, especially in the liver, kidneys and spleen. Females showed more intense and more severe liver histopathological changes when agomelatine was combined with simvastatin and metformin. Females were also more sensitive to renal histopathological changes and renal atrophy than males when using metformin as monotherapy or associated with agomelatine. The spleen was significantly affected, particularly in females, in line with the changes observed in the erythrogram. The antidepressant activity of agomelatine in males was significantly reduced with the concomitant use of metformin. The result of the forced swimming test signals the need to investigate potential interactions of agomelatine and other drugs that may lead to a decrease in its antidepressant activity.

Keywords: Polypharmacy. Agomelatine. Losartan. Simvastatin. Metformin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Estrutura molecular da agomelatina – designação química: N-[2-(7-metoxi-1-naftil)-etil]acetamida	44
Figura 2	– Estrutura molecular da losartana – designação química: 2-butyl-4-chloro-1-[[2'-(2H-tetrazol-5-yl)[1,1'-biphenyl]-4-yl]methyl]-1H-imidazole-5-methanol;2-n-butyl-4-chloro-5-hydroxymethyl-1-[[2'-(1H-tetrazol-5-yl)biphenyl-4-yl]methyl]imidazole;2-butyl-4-chloro-1-[p-(o-1H-tetrazol-5-ylphenyl)benzyl]imidazole-5-methanol	46
Figura 3	– Estrutura molecular da sinvastatina – designação química: [(1S,3R,7S,8S,8aR)-8-[2-[(2R,4R)-4-hydroxy-6-oxooxan-2-yl]ethyl]-3,7-dimethyl-1,2,3,7,8,8a-hexahydronaphthalen-1-yl]2,2-dimethylbutanoate ..	49
Figura 4	– Estrutura molecular da metformina – designação química: 1,1-dimethylguanidine	50
Figura 5	– Linha do tempo referente ao tratamento subcrônico de ratos <i>Wistar</i> com agomelatina, losartana, sinvastatina e metformina isolados ou em associações	57
Figura 6	– Fotomicrografia de fígado do animal 5M (macho) do grupo agomelatina (G2) mostrando tumefação celular. Coloração hematoxilina-eosina, aumento de 400X	161
Figura 7	– Fotomicrografias do fígado do animal 3M (macho) do grupo sinvastatina (G4) mostrando cordões de hepatócitos com tumefação celular, focos inflamatórios dispersos e esteatose microvesicular Coloração hematoxilina-eosina, aumentos de 200X (A) e 400X (B e C).....	163
Figura 8	– Fotomicrografias do fígado do animal 6F (fêmea) do grupo agomelatina+sinvastatina (G8) mostrando cordões de hepatócitos desorganizados, hemorragia sinusoidal e focos inflamatórios dispersos, além de necrose focal de hepatócitos. Coloração hematoxilina-eosina, aumentos de 200X (A) e 400X (B e C).....	164
Figura 9	– Fotomicrografias do fígado do animal 5F (fêmea) do grupo agomelatina+metformina (G9) mostrando cordões de hepatócitos com tumefação celular, hemorragia sinusoidal e focos inflamatórios dispersos, além de necrose focal de hepatócitos. Coloração hematoxilina-eosina, aumentos de 200X (A) e 400X (B).....	165
Figura 10	– Fotomicrografias de rim do animal 4F (fêmea) do grupo metformina (G5) mostrando vacuolização difusa do epitélio tubular, cilindros hialinos cortico-medulares, células inflamatórias dispersas e focos de descamação do epitélio tubular na junção cortico-medular, sugestivo de necrose tubular	168

aguda. Coloração hematoxilina-eosina, aumentos de 200X (A) e 400x (B e C).....

- Figura 11 – Fotomicrografias de rim do animal 5F (fêmea) do grupo metformina (G5) vacuolização difusa do epitélio tubular, congestão vascular cortical e múltiplos focos de descamação do epitélio tubular na junção cortico-medular, sugestivo de necrose tubular aguda. Coloração hematoxilina-eosina, aumentos de 200X (A) e 400x (B e C)..... 169
- Figura 12 – Fotomicrografias de rim do animal 3M (macho) do grupo metformina (G5) mostrando tumefação acentuada do epitélio tubular, por vezes com colapso da luz do túbulo, degeneração vacuolar, descamação do epitélio tubular proximal, congestão vascular cortical e focos de infiltrado linfocitário. Coloração hematoxilina-eosina, aumentos de 200X (A e B) e 400x (C e D).. 170
- Figura 13 – Fotomicrografia de estômago do animal 4M (macho) do grupo agomelatina (G2) mostrando vasos ectásicos e células de citoplasma granular consistentes com mastócitos localizados em região perivascular na cárdia. Coloração hematoxilina-eosina, aumento de 200X..... 171
- Figura 14 – Fotomicrografia de estômago do animal 2F (fêmea) do grupo agomelatina (G2) mostrando pequenos focos inflamatórios na região fúndica. Coloração hematoxilina-eosina, aumento de 200X..... 171
- Figura 15 – Fotomicrografia de baço do animal 6F (fêmea) do grupo metformina (G5) mostrando a presença acentuada de hemossiderófagos e de megacariócitos. Coloração hematoxilina-eosina, aumento de 200X. 174
- Figura 16 – Fotomicrografia de baço do animal 4M (macho) do grupo sinvastatina (G4) mostrando a presença acentuada de hemossiderófagos e de megacariócitos. Coloração hematoxilina-eosina, aumento de 200X. 174

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	– Resultado da análise do número de leucócitos totais nos animais fêmeas. Comparação do grupo agomelatina usada em monoterapia (AGO) com os grupos de associações da agomelatina com outros fármacos (n=6 animais/grupo)	62
Gráfico 2	– Resultado da análise do número de leucócitos totais nos animais fêmeas. Comparação do grupo sinvastatina usada em monoterapia (SIN) com os grupos de associações da sinvastatina com outros fármacos (n=6 animais/grupo)	63
Gráfico 3	– Resultado da análise do número de leucócitos totais em fêmeas e machos. Comparação entre sexos (n=6 animais/grupo)	64
Gráfico 4	– Resultado da análise do número absoluto de linfócitos nos animais fêmeas. Comparação do grupo agomelatina usada em monoterapia (AGO) com os grupos de associações da agomelatina com outros fármacos (n=6 animais/grupo)	65
Gráfico 5	– Resultado da análise do número absoluto de linfócitos nos animais fêmeas. Comparação do grupo sinvastatina usada em monoterapia (SIN) com os grupos de associações da sinvastatina com outros fármacos (n=6 animais/grupo)	66
Gráfico 6	– Resultado da análise do número absoluto de linfócitos em fêmeas e machos. Comparação entre sexos (n=6 animais/grupo)	67
Gráfico 7	– Resultado da análise do número absoluto de monócitos/eosinófilos/basófilos nos animais machos. Comparação dos grupos entre si (n=6 animais/grupo).....	69
Gráfico 8	– Resultado da análise do número absoluto de monócitos/eosinófilos/basófilos em fêmeas e machos. Comparação entre sexos (n=6 animais/grupo).....	70
Gráfico 9	– Resultado da análise do número absoluto de eritrócitos nos animais fêmeas. Comparação dos grupos com o grupo controle salina (SAL) (n=6 animais/grupo).....	71
Gráfico 10	– Resultado da análise do número absoluto de eritrócitos nos animais fêmeas. Comparação do grupo agomelatina usada em monoterapia (AGO) com os grupos de associações da agomelatina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).....	72

Gráfico 11 – Resultado da análise do número absoluto de eritrócitos nos animais fêmeas. Comparação do grupo losartana usada em monoterapia (LOS) com os grupos de associações da losartana com outros fármacos (n=6 animais/grupo).....	73
Gráfico 12 – Resultado da análise do número absoluto de eritrócitos nos animais fêmeas. Comparação do grupo sinvastatina usada em monoterapia (SIN) com os grupos de associações da sinvastatina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).....	74
Gráfico 13 – Resultado da análise do número absoluto de eritrócitos nos animais fêmeas. Comparação do grupo metformina usada em monoterapia (MET) com os grupos de associações da metformina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).....	75
Gráfico 14 – Resultado da análise do número absoluto de eritrócitos nos animais machos. Comparação do grupo agomelatina usada em monoterapia (AGO) com os grupos de associações da agomelatina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).....	76
Gráfico 15 – Resultado da análise do número absoluto de eritrócitos nos animais machos. Comparação do grupo sinvastatina usada em monoterapia (SIN) com os grupos de associações da sinvastatina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).....	77
Gráfico 16 – Resultado da análise da hemoglobina nos animais fêmeas. Comparação do grupo agomelatina usada em monoterapia (AGO) com os grupos de associações da agomelatina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).....	78
Gráfico 17 – Resultado da análise da hemoglobina nos animais fêmeas. Comparação do grupo losartana usada em monoterapia (LOS) com os grupos de associações da losartana com outros fármacos (n=6 animais/grupo).....	79
Gráfico 18 – Resultado da análise da hemoglobina nos animais machos. Comparação dos grupos entre si (n=6 animais/grupo).....	80
Gráfico 19 – Resultado da análise da hemoglobina nos animais machos. Comparação do grupo agomelatina usada em monoterapia (AGO) com os grupos de associações da agomelatina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).....	81
Gráfico 20 – Resultado da análise da hemoglobina nos animais machos. Comparação do grupo losartana usada em monoterapia (LOS) com os grupos de associações da losartana com outros fármacos (n=6 animais/grupo).....	82
Gráfico 21 – Resultado da análise da hemoglobina nos animais machos. Comparação do grupo sinvastatina usada em monoterapia (SIN) com os grupos de associações da sinvastatina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).....	83

Gráfico 22	– Resultado da análise da hemoglobina nos animais machos. Comparação do grupo metformina usada em monoterapia (MET) com os grupos de associações da metformina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).....	84
Gráfico 23	– Resultado da análise da hemoglobina nos animais machos. Comparação do grupo da associação de agomelatina com losartana com o grupo da associação de agomelatina, losartana, sinvastatina e metformina (n=6 animais/grupo).....	85
Gráfico 24	– Resultado da análise da hemoglobina em fêmeas e machos. Comparação entre sexos (n=6 animais/grupo).....	86
Gráfico 25	– Resultado da análise do hematócrito nos animais fêmeas. Comparação dos grupos de tratamento com o grupo controle salina (SAL) (n=6 animais/grupo).....	87
Gráfico 26	– Resultado da análise do hematócrito nos animais fêmeas. Comparação do grupo agomelatina em monoterapia (AGO) com os grupos de associação da agomelatina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).....	88
Gráfico 27	– Resultado da análise do hematócrito nos animais fêmeas. Comparação do grupo losartana em monoterapia (LOS) com os grupos de associação da losartana com outros fármacos (n=6 animais/grupo).....	89
Gráfico 28	– Resultado da análise do hematócrito nos animais fêmeas. Comparação do grupo sinvastatina em monoterapia (SIN) com os grupos de associação da sinvastatina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).....	90
Gráfico 29	– Resultado da análise do hematócrito nos animais fêmeas. Comparação do grupo metformina em monoterapia (MET) com os grupos de associação da metformina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).....	91
Gráfico 30	– Resultado da análise do hematócrito nos animais machos. Comparação do grupo agomelatina em monoterapia (AGO) com os grupos de associação da agomelatina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).....	92
Gráfico 31	– Resultado da análise do hematócrito em fêmeas e machos. Comparação entre sexos (n=6 animais/grupo).....	93
Gráfico 32	– Resultado da análise do volume corpuscular médio em fêmeas e machos. Comparação entre sexos (n=6 animais/grupo).....	94
Gráfico 33	– Resultado da análise da hemoglobina corpuscular média em machos. Comparação dos grupos entre si (n=6 animais/grupo).....	95

Gráfico 34 – Resultado da análise da hemoglobina corpuscular média em fêmeas e machos. Comparação entre sexos (n=6 animais/grupo).....	96
Gráfico 35 – Resultado da análise da concentração de hemoglobina corpuscular média em machos. Comparação dos grupos entre si (n=6 animais/grupo).....	97
Gráfico 36 – Resultado da análise da concentração de hemoglobina corpuscular média em fêmeas e machos. Comparação entre sexos (n=6 animais/grupo).....	98
Gráfico 37 – Resultado da análise do índice de anisocitose nos animais fêmeas. Comparação dos grupos de tratamento com o grupo controle salina (SAL) (n=6 animais/grupo).....	99
Gráfico 38 – Resultado da análise do índice de anisocitose nos animais fêmeas. Comparação do grupo agomelatina em monoterapia (AGO) com os grupos de associação da agomelatina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).....	100
Gráfico 39 – Resultado da análise do índice de anisocitose nos animais fêmeas. Comparação do grupo sinvastatina em monoterapia (SIN) com os grupos de associação da sinvastatina com outros fármacos (n=6 animais/grupo)...	101
Gráfico 40 – Resultado da análise do índice de anisocitose nos animais fêmeas. Comparação do grupo metformina em monoterapia (MET) com os grupos de associação da metformina com outros fármacos (n=6 animais/grupo)...	102
Gráfico 41 – Resultado da análise do índice de anisocitose nos animais machos. Comparação dos grupos entre si (n=6 animais/grupo).....	103
Gráfico 42 – Resultado da análise da contagem de plaquetas nos animais fêmeas. Comparação do grupo sinvastatina em monoterapia (SIN) com os grupos de associação da sinvastatina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).	104
Gráfico 43 – Resultado da análise da contagem de plaquetas nos animais fêmeas. Comparação do grupo mentformina em monoterapia (MET) com os grupos de associação da metformina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).	105
Gráfico 44 – Resultado da análise da contagem de plaquetas dos animais machos. Comparação dos grupos entre si (n=6 animais/grupo).	106
Gráfico 45 – Resultado da análise da contagem de plaquetas em fêmeas e machos. Comparação entre sexos (n=6 animais/grupo).	107

Gráfico 46 – Resultado da análise do colesterol total nos animais fêmeas. Comparação dos grupos de tratamento com o grupo controle salina (SAL) (n=6 animais/grupo).....	112
Gráfico 47 – Resultado da análise do colesterol total nos animais fêmeas. Comparação do grupo metformina em monoterapia (MET) com os grupos de associação da metformina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).....	113
Gráfico 48 – Resultado da análise do colesterol total em fêmeas e machos. Comparação entre sexos (n=6 animais/grupo).....	114
Gráfico 49 – Resultado da análise dos triglicérides nos animais fêmeas. Comparação dos grupos de tratamento com o grupo controle salina (SAL) (n=6 animais/grupo).....	115
Gráfico 50 – Resultado da análise de triglicérides nos animais fêmeas. Comparação do grupo metformina em monoterapia (MET) com os grupos de associação da metformina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).....	116
Gráfico 51 – Resultado da análise dos triglicérides nos animais machos. Comparação dos grupos de tratamento com o grupo controle salina (SAL) (n=6 animais/grupo).....	117
Gráfico 52 – Resultado da análise de triglicérides nos animais machos. Comparação do grupo sinvastatina em monoterapia (SIN) com os grupos de associação da sinvastatina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).....	118
Gráfico 53 – Resultado da análise de triglicérides em fêmeas e machos. Comparação entre sexos (n=6 animais/grupo).....	119
Gráfico 54 – Resultado da análise da bilirrubina total nos animais fêmeas. Comparação dos grupos de tratamento com o grupo controle salina (SAL) (n=6 animais/grupo).....	120
Gráfico 55 – Resultado da análise de bilirrubina total nos animais fêmeas. Comparação do grupo agomelatina em monoterapia (AGO) com os grupos de associação da agomelatina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).....	121
Gráfico 56 – Resultado da análise de bilirrubina total nos animais fêmeas. Comparação do grupo losartana em monoterapia (LOS) com os grupos de associação da losartana com outros fármacos (n=6 animais/grupo).....	122
Gráfico 57 – Resultado da análise de bilirrubina total nos animais fêmeas. Comparação do grupo sinvastatina em monoterapia (SIN) com os grupos de associação da sinvastatina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).....	123

Gráfico 58	– Resultado da análise de bilirrubina total nos animais fêmeas. Comparação do grupo metformina em monoterapia (MET) com os grupos de associação da metformina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).....	124
Gráfico 59	– Resultado da análise de bilirrubina total nos animais fêmeas. Comparação dos grupos de associações de fármacos (n=6 animais/grupo).....	125
Gráfico 60	– Resultado da análise de bilirrubina total nos animais machos. Comparação dos grupos de associações de fármacos (n=6 animais/grupo).	126
Gráfico 61	– Resultado da análise da bilirrubina total em fêmeas e machos. Comparação entre sexos (n=6 animais/grupo).....	127
Gráfico 62	– Resultado da análise de fosfatase alcalina nos animais fêmeas. Comparação dos grupos de tratamento com o grupo controle salina (SAL) (n=6 animais/grupo).....	128
Gráfico 63	– Resultado da análise da fosfatase alcalina total nos animais fêmeas. Comparação do grupo metformina em monoterapia (MET) com os grupos de associação da metformina com outros fármacos (n=6 animais/grupo)...	129
Gráfico 64	– Resultado da análise da fosfatase alcalina em fêmeas e machos. Comparação entre sexos (n=6 animais/grupo).....	130
Gráfico 65	– Resultado da análise de alanina aminotransferase nos animais fêmeas. Comparação dos grupos de tratamento com o grupo controle salina (SAL) (n=6 animais/grupo).....	131
Gráfico 66	– Resultado da análise da alanina aminotrasferase nos animais fêmeas. Comparação do grupo agomelatina em monoterapia (AGO) com os grupos de associação da agomelatina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).....	132
Gráfico 67	– Resultado da análise da alanina aminotrasferase nos animais fêmeas. Comparação do grupo losartana em monoterapia (LOS) com os grupos de associação da losartana com outros fármacos (n=6 animais/grupo).....	133
Gráfico 68	– Resultado da análise da alanina aminotrasferase nos animais fêmeas. Comparação do grupo sinvastatina em monoterapia (SIN) com os grupos de associação da sinvastatina com outros fármacos (n=6 animais/grupo)...	134
Gráfico 69	– Resultado da análise da alanina aminotrasferase nos animais fêmeas. Comparação do grupo metformina em monoterapia (MET) com os grupos de associação da metformina com outros fármacos (n=6 animais/grupo)...	135

Gráfico 70 – Resultado da análise de alanina aminotransferase nos animais fêmeas. Comparação dos grupos de associações de fármacos (n=6 animais/grupo).	136
Gráfico 71 – Resultado da análise da alanina aminotransferase nos animais machos. Comparação dos grupos entre si (n=6 animais/grupo).....	137
Gráfico 72 – Resultado da análise da aspartato aminotransferase em fêmeas e machos. Comparação entre sexos (n=6 animais/grupo).....	138
Gráfico 73 – Resultado da análise da glicose nos animais fêmeas. Comparação dos grupos de tratamento com o grupo controle salina (SAL) (n=6 animais/grupo).....	139
Gráfico 74 – Resultado da análise de glicose nos animais fêmeas. Comparação do grupo losartana em monoterapia (LOS) com grupos de associações da losartana com outros fármacos (n=6 animais/grupo).....	140
Gráfico 75 – Resultado da análise de glicose nos animais fêmeas. Comparação do grupo sinvastatina em monoterapia (SIN) com grupos de associações da sinvastatina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).....	141
Gráfico 76 – Resultado da análise de glicose nos animais fêmeas. Comparação do grupo metformina em monoterapia (MET) com grupos de associações da metformina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).....	142
Gráfico 77 – Resultado da análise da glicose nos animais machos. Comparação dos grupos de tratamento com o grupo controle salina (SAL) (n=6 animais/grupo).....	143
Gráfico 78 – Resultado da análise de glicose nos animais machos. Comparação do grupo agomelatina em monoterapia (AGO) com grupos de associações da agomelatina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).....	144
Gráfico 79 – Resultado da análise de glicose nos animais machos. Comparação do grupo losartana em monoterapia (LOS) com grupos de associações da losartana com outros fármacos (n=6 animais/grupo).....	145
Gráfico 80 – Resultado da análise de glicose nos animais machos. Comparação do grupo sinvastatina em monoterapia (SIN) com grupos de associações da sinvastatina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).....	146
Gráfico 81 – Resultado da análise de glicose nos animais machos. Comparação do grupo metformina em monoterapia (MET) com grupos de associações da metformina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).....	147

Gráfico 82 – Resultado da análise da glicose em fêmeas e machos. Comparação entre sexos (n=6 animais/grupo).....	148
Gráfico 83 – Resultado da análise de ureia nos animais fêmeas. Comparação dos grupos de associações de fármacos (n=6 animais/grupo).....	149
Gráfico 84 – Resultado da análise de creatinina nos animais fêmeas. Comparação dos grupos de tratamento com o grupo controle salina (SAL) (n=6 animais/grupo).....	150
Gráfico 85 – Resultado da análise da creatinina nos animais fêmeas. Comparação do grupo agomelatina em monoterapia (AGO) com grupos de associações da agomelatina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).....	151
Gráfico 86 – Resultado da análise da creatinina nos animais fêmeas. Comparação do grupo losartana em monoterapia (LOS) com grupos de associações da agomelatina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).....	152
Gráfico 87 – Resultado da análise da creatinina nos animais fêmeas. Comparação do grupo sinvastatina em monoterapia (SIN) com grupos de associações da sinvastatina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).....	153
Gráfico 88 – Resultado da análise da creatinina nos animais fêmeas. Comparação do grupo metformina em monoterapia (MET) com grupos de associações da metformina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).....	154
Gráfico 89 – Resultado da análise da creatinina nos animais fêmeas. Comparação dos grupos de associações de fármacos (n=6 animais/grupo).....	155
Gráfico 90 – Resultado da análise de creatinina em fêmeas e machos. Comparação entre sexos (n=6 animais/grupo).....	156
Gráfico 91 – Resultado do teste do nado forçado nos animais machos com grupos experimentais comparados entre si (n=6 animais/grupo)	178

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Identificação e composição dos grupos experimentais.....	55
Tabela 2	– Conversão de doses entre humanos e ratos	56
Tabela 3	– Aspectos histopatológicos avaliados por órgão	61
Tabela 4	– Média \pm erro padrão da média dos parâmetros hematológicos analisados e comparação entre sexos dos grupos em monoterapia (G1 a G5)	111
Tabela 5	– Média \pm erro padrão da média dos parâmetros hematológicos analisados e comparação entre sexos – grupos em uso de combinações de fármacos (G6 a G10)	112
Tabela 6	– Média \pm erro padrão da média dos parâmetros bioquímicos analisados e comparação entre sexos – grupos em a (G1 a G5)	160
Tabela 7	– Média \pm erro padrão da média dos parâmetros bioquímicos analisados e comparação entre sexos - grupos em uso de combinações de fármacos (G6 a G10)	161
Tabela 8	– Média \pm erro padrão da média do peso absoluto dos órgãos dos animais machos	178
Tabela 9	– Média \pm erro padrão da média do peso absoluto dos órgãos dos animais fêmeas	179

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT _{2C}	Receptor de serotonina
AGO	Agomelatina
AL	Agomelatina + Losartana
ALSM	Agomelatina + Losartana + Sinvastatina + Metformina
ALT	Alanina aminotransferase
AM	Agomelatina + Metformina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APA	<i>American Psychiatric Association</i> /Associação Americana de Psiquiatria
ARA-II	Antagonista dos Receptores de Angiotensina II
AS	Agomelatina + Sinvastatina
AST	Aspartato aminotransferase
AT ₁	Receptor de Angiotensina II
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
CYP	Superfamília de proteínas responsáveis pela biotransformação de fármacos no fígado
DAE	Dose Animal Equivalente
DFP	Departamento de Fisiologia e Farmacologia
DHE	Dose Humana Equivalente
DM	Diabetes <i>Mellitus</i>
DM2	Diabetes <i>Mellitus</i> tipo 2
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra Acético
G1	Grupo controle salina
G10	Grupo em uso de Agomelatina + Losartana + Sinvastatina + Metformina
G10/ALSM	Grupo em uso de Agomelatina + Losartana + Sinvastatina + Metformina

G2	Grupo em uso de Agomelatina
G2/AGO	Grupo em uso de Agomelatina
G3	Grupo em uso de Losartana
G3/LOS	Grupo em uso de Losartana
G4	Grupo em uso de Sinvastatina
G4/SIN	Grupo em uso de Sinvastatina
G5	Grupo em uso de Metformina
G5/MET	Grupo em uso de Metformina
G6	Grupo em uso de Losartana + Sinvastatina + Metformina
G6/LSM	Grupo em uso de Losartana + Sinvastatina + Metformina
G7	Grupo em uso de Agomelatina + Losartana
G7/AL	Grupo em uso de Agomelatina + Losartana
G8	Grupo em uso de Agomelatina + Sinvastatina
G8/AS	Grupo em uso de Agomelatina + Sinvastatina
G9	Grupo em uso de Agomelatina + Metformina
G9/AM	Grupo em uso de Agomelatina + Metformina
Gama GT	Gama Glutamil-Transpeptidase
GI/SAL	Grupo controle salina
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
HCT	Hematócrito
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i> /Lipoproteína de Alta Densidade
HDL-c	<i>High Density Lipoprotein</i> /Lipoproteína de Alta Densidade rica em colesterol
HE	Hematoxilina Eosina
HGB	Hemoglobina
HMG-CoA	3-Hidroxi-2-Metil-Glutaril Coenzima A

IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
iECA	Inibidores da Enzima Conversora da Angiotensina
IM	Interação Medicamentosa
ISRS	Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i> /Lipoproteína de Baixa Densidade
LDL-c	<i>Low Density Lipoprotein</i> /Lipoproteína de Baixa Densidade rica em colesterol
LOS	Losartana
LSM	Losartana + Sinvastatina + Metformina
MALA	<i>Metformin-associated lactic acidosis</i> /Acidose Láctica Associada a Metformina
MET	Metformina
MT ₁	Receptor de Melatonina 1
MT ₂	Receptor de Melatonina 2
NASH	<i>Nonalcoholic steatohepatitis</i> /Esteatohepatite Não Alcoólica
NOEL	<i>No-observed-adverse-effect level</i> /Nível de efeito adverso não observado
NPDM	Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos
NTA	Necrose Tubular Aguda
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i> /Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	Pressão Arterial
PLT	Plaquetas
RDW	<i>Red Cell Distribution Width</i> /Amplitude de Distribuição dos Glóbulos Vermelhos
RENAME	Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
SAL	Salina
SBC	Sociedade Brasileira de Cardiologia
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes

SIN	Sinvastatina
SUS	Sistema Único de Saúde
TG	Triglicérides
UFC	Universidade Estadual do Ceará
USA	<i>United States of America</i> /Estados Unidos da América
VCM	Volume Corpuscular Médio
WHO	<i>World Health Organization</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
®	Marca Registrada
K _M	Fator de correção de dose de mg/kg para mg/m ²
mg	Miligrama
mmHg	Milímetro de mercúrio
mg/dL	Miligrama por decilitro
g	Gramma
cm	Centímetro
°C	Grau Celsius
h	Hora
mg/kg	Miligrama por quilograma
kg	Quilograma
m ²	Metro quadrado
mm	Milímetro
ml	Mililitro
rpm	Rotacões por minuto
L	Litro
g/dL	Gramma por decilitro
fL	Fentilitro
pg	Picograma
U/L	Unidade por litro
X	Aumento (vezes)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	32
2	OBJETIVOS	36
2.1	Geral	36
2.2	Específicos	36
3	REVISÃO DE LITERATURA	37
3.1	3.1 Farmacoterapia, polifarmácia e segurança do paciente	37
3.2	Avaliação da toxicidade de substâncias: testes de toxicidade subcrônica - OECD, Teste 408	40
3.2.1	<i>Análises hematológicas e bioquímicas</i>	41
3.2.2	<i>Análises histopatológicas</i>	41
3.3	Fármacos do estudo: agomelatina, losartana, sinvastatina e metformina - usos terapêuticos e potenciais tóxicos	42
3.3.1	<i>Agomelatina</i>	43
3.3.2	<i>Losartana</i>	45
3.3.3	<i>Sinvastatina</i>	47
3.3.4	<i>Metformina</i>	49
4	MATERIAL E MÉTODOS	52
4.1	Local	52
4.2	Animais e grupos experimentais	52
4.3	Fármacos, doses e protocolo de tratamento	53
4.4	Linha do tempo	56
4.5	Análises hematológicas	57
4.6	Análises bioquímicas	57
4.7	Análises histopatológicas	58
4.8	Teste do nado forçado	59
4.9	Análise dos dados	60

5	RESULTADOS	61
5.1	Resultados das análises hematológicas	61
5.1.1	<i>Leucócitos totais</i>	62
5.1.1.1	<i>Fêmeas</i>	62
5.1.1.2	<i>Machos</i>	64
5.1.1.3	<i>Comparação entre sexos</i>	64
5.1.2	<i>Linfócitos absolutos</i>	65
5.1.2.1	<i>Fêmeas</i>	65
5.1.2.2	<i>Machos</i>	67
5.1.2.3	<i>Comparação entre sexos</i>	67
5.1.3	<i>Linfócitos percentual (%)</i>	68
5.1.4	<i>Monócitos/eosinófilos/basófilos (absolutos)</i>	68
5.1.4.1	<i>Fêmeas</i>	68
5.1.4.2	<i>Machos</i>	68
5.1.4.3	<i>Comparação entre sexos</i>	70
5.1.5	<i>Monócitos/eosinófilo/basófilos percentual (%)</i>	70
5.1.6	<i>Granulócitos absolutos e percentual</i>	70
5.1.7	<i>Eritrócitos</i>	71
5.1.7.1	<i>Fêmeas</i>	71
5.1.7.2	<i>Machos</i>	76
5.1.7.3	<i>Comparação entre sexos</i>	78
5.1.8	<i>Hemoglobina</i>	78
5.1.8.1	<i>Fêmeas</i>	78
5.1.8.2	<i>Machos</i>	80
5.1.8.3	<i>Comparação entre sexos</i>	86
5.1.9	<i>Hematócrito</i>	87
5.1.9.1	<i>Fêmeas</i>	87

5.1.9.2	<i>Machos</i>	92
5.1.9.3	<i>Comparação entre sexos</i>	92
5.1.10	<i>Volume cosrpuscular médio (VCM)</i>	94
5.1.11	<i>Hemoglobina corpuscular média (HCM)</i>	95
5.1.11.1	<i>Fêmeas</i>	95
5.1.11.2	<i>Machos</i>	95
5.1.11.3	<i>Comparação entre sexos</i>	96
5.1.12	<i>Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)</i>	97
5.1.12.1	<i>Fêmeas</i>	97
5.1.12.2	<i>Machos</i>	97
5.1.12.3	<i>Comparação entre sexos</i>	98
5.1.13	<i>Índice de anisocitose (RDW)</i>	99
5.1.13.1	<i>Fêmeas</i>	99
5.1.13.2	<i>Machos</i>	103
5.1.13.3	<i>Comparação entre sexos</i>	104
5.1.14	<i>Contagem de plaquetas (PLT)</i>	104
5.1.14.1	<i>Fêmeas</i>	104
5.1.14.2	<i>Machos</i>	106
5.1.14.3	<i>Comparação entre sexos</i>	107
5.1.15	<i>Tabelas dos parâmetros hematológicos comparados entre sexos</i>	108
5.2	Resultados das análises bioquímicas	111
5.2.1	<i>Colesterol total</i>	112
5.2.1.1	<i>Fêmeas</i>	112
5.2.1.2	<i>Machos</i>	114
5.2.1.3	<i>Comparação entre sexos</i>	114
5.2.2	<i>Triglicérides</i>	115
5.2.2.1	<i>Fêmeas</i>	115

5.2.2.2	<i>Machos</i>	117
5.2.2.3	<i>Comparação entre sexos</i>	119
5.2.3	<i>Bilirrubina total</i>	120
5.2.3.1	<i>Fêmeas</i>	120
5.2.3.2	<i>Machos</i>	126
5.2.3.3	<i>Comparação entre sexos</i>	127
5.2.4	<i>Bilirrubina direta</i>	127
5.2.5	<i>Fosfatase alcalina</i>	128
5.2.5.1	<i>Fêmeas</i>	128
5.2.5.2	<i>Machos</i>	129
5.2.5.3	<i>Comparação entre sexos</i>	130
5.2.6	<i>Gama glutamil transpeptidase (gama GT)</i>	130
5.2.7	<i>Alanina aminotransferase (ALT)</i>	131
5.2.7.1	<i>Fêmeas</i>	131
5.2.7.2	<i>Machos</i>	137
5.2.7.3	<i>Comparação entre sexos</i>	138
5.2.8	<i>Aspartato aminotransferase (AST)</i>	138
5.2.9	<i>Glicose</i>	139
5.2.9.1	<i>Fêmeas</i>	139
5.2.9.2	<i>Machos</i>	143
5.2.9.3	<i>Comparação entre sexos</i>	148
5.2.10	<i>Ureia</i>	149
5.2.10.1	<i>Fêmeas</i>	149
5.2.10.2	<i>Machos e comparação entre sexos</i>	150
5.2.11	<i>Creatinina</i>	150
5.2.11.1	<i>Fêmeas</i>	150
5.2.11.2	<i>Machos</i>	156

5.2.11.3	<i>Comparação entre sexos</i>	156
5.2.12	<i>Tabela dos parâmetros bioquímicos comparados entre sexo</i>	157
5.3	Resultados das análises histopatológicas	160
5.3.1	<i>Síntese dos achados histopatológicos por órgão</i>	160
5.3.1.1	<i>Fígado</i>	160
5.3.1.2	<i>Rim</i>	166
5.3.1.3	<i>Estômago</i>	170
5.3.1.4	<i>Intestino</i>	172
5.3.1.5	<i>Baço</i>	172
5.3.1.6	<i>Pâncreas</i>	175
5.3.1.7	<i>Coração</i>	175
5.3.2	<i>Peso dos órgãos</i>	176
5.4	Resultado do teste do nado forçado	178
6	DISCUSSÃO	179
7	CONCLUSÃO	198
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	199
8.1	Limitações do estudo	199
8.2	Perspectivas futuras	200
	REFERÊNCIAS	201
	ANEXO A – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	212

1 INTRODUÇÃO

Com a crescente longevidade, inclusive na população brasileira, observa-se o aumento na incidência de doenças crônicas degenerativas, bem como de depressão crônica, com consequente incremento no uso de medicamentos, acarretando na ocorrência do fenômeno conhecido como polifarmácia (IBGE, 2017; MACHADO-ALBA *et al.*, 2017; McGRATH *et al.*, 2017; ORTIZ, GARCIA, CASTILHO, 2017; PAGE *et al.*, 2019). O emprego concomitante de múltiplos fármacos torna-se comum e traz consigo o risco elevado de interações medicamentosas. Isso pode levar à ocorrência de efeitos adversos, ou causar modificações nos efeitos terapêuticos e tóxicos dos fármacos reduzindo ou aumentando sua ação podendo, em ambas as situações, acarretar consequências graves para a saúde do paciente (McGRATH *et al.*, 2017; WHO, 2017).

Assim, a interação medicamentosa é uma das variáveis que afeta o resultado terapêutico e quanto maior o número de medicamentos que o paciente recebe, maior a possibilidade de que esta interação venha a acontecer. A ocorrência de interação medicamentosa está relacionada à idade, sexo, número de medicamentos em uso, duração do tratamento, entre outros fatores (CRUCIOL-SOUZA, THOMSON, 2006). Embora em algumas situações a combinação de fármacos tenha finalidade terapêutica, sabe-se que existem interações medicamentosas que podem levar a aumento da toxicidade ou à redução dos benefícios terapêuticos, comprometendo a segurança do paciente (OBACH, 2003).

A eficácia e a segurança são, portanto, os dois objetivos principais no desenvolvimento dos medicamentos e devem caminhar juntos. No entanto, a segurança está associada a fatores que não dependem somente do fármaco. Um destes fatores é a associação medicamentosa, que se torna um desafio à segurança do paciente, podendo impactar também na eficácia dos medicamentos usados concomitantemente (TANNENBAUM, SHHEHAN, 2014). Outro fator que está relacionado com a segurança do fármaco é o tempo de tratamento. Assim, com a maior expectativa de vida da população é comum que pacientes usem medicamentos isolados ou associados durante um longo período de suas vidas (McGRATH *et al.*, 2017; WHO, 2017; PAGE *et al.*, 2019).

Condição psiquiátrica cada vez mais comum na população mundial, a depressão tem sido apontada como a principal causa de incapacidade com taxas crescentes de prevalência variando de 20% a 25% em mulheres e 7% a 12% em homens (WANG *et al.*, 2017). A depressão crônica requer o uso de fármacos por longos períodos – os antidepressivos, a exemplo da agomelatina – e outros medicamentos de uso contínuo, a exemplo dos anti-hipertensivos,

antidiabéticos e fármacos usados para o controle do colesterol e triglicerídeos, comorbidades muitas vezes presentes nos pacientes com depressão, especialmente, mas não exclusivamente, em idosos (SPINA, TRIFIRO, CARACI, 2012; MACHADO-ALBA *et al.*, 2017; ORTIZ, GARCIA, CASTILLHO, 2017; CHAVES FILHO *et al.*, 2018).

Uma recente opção terapêutica para o tratamento da depressão é a agomelatina, um derivado da melatonina, que atua como agonista nos receptores de melatonina MT₁ e MT₂, e antagonista no receptor 5-HT_{2C}, produzindo liberação de dopamina e de noradrenalina sem variar as concentrações de serotonina na fenda sináptica (MILLAN, 2005; SOUMIER *et al.*, 2009; SANSONE, SANSONE, 2011). Os estudos de toxicidade pré-clínicos indicaram toxicidade aguda relativamente baixa, com efeito sedativo e hepatotoxicidade em doses repetidas de agomelatina (GOODWIN *et al.*, 2009).

No Brasil, a agomelatina é comercializada como fármaco de referência (Valdoxan®, laboratório Servier do Brasil), não havendo medicamento genérico até o presente momento, sendo adquirida em farmácias comerciais. O fármaco faz parte da Lista C1 de Substâncias de Controle Especial da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) necessitando, portanto, de receita de controle especial em duas vias (ANVISA, 2019). Embora bastante utilizada, a agomelatina tem sido frequentemente descrita na literatura mundial como hepatotóxica (CARVALHO *et al.*, 2016; SOUTO *et al.*, 2019).

Na população brasileira, é cada vez mais comum o uso de fármacos para o controle de doenças crônicas degenerativas. Dentre os mais utilizados estão a losartana, como anti-hipertensivo, e a sinvastatina, para o dislipidemia, ambos disponíveis gratuitamente no Sistema Único de Saúde (SUS), constando na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) do Ministério da Saúde, sendo também comercializados como medicamentos de referência, genéricos ou similares; também a metformina, como hipoglicemiante oral que, embora não conste na RENAME, é um dos fármacos de primeira escolha para o tratamento do diabetes *melittus* tipo 2 (DM2) recomendado nas Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018; SBD, 2019).

A losartana é um antagonista dos receptores da angiotensina II (ARA-II) de uso na terapêutica anti-hipertensiva devido principalmente ao bloqueio seletivo dos receptores AT₁ e consequente redução do efeito pressórico da angiotensina II. É amplamente utilizado no controle da hipertensão e insuficiência cardíaca, particularmente em pacientes que desenvolvem tosse com inibidores da enzima conversora de angiotensina (iECA). Também é usado para reduzir o risco de acidente vascular cerebral em pacientes com hipertrofia ventricular esquerda e no tratamento da nefropatia diabética (AL-MAJED *et al.*, 2015). A losartana não apresenta

efeitos adversos relevantes sobre o metabolismo, exceto quando em superdosagem e na gravidez (SICA, GEHR, GHOSH, 2005; AL-MAJED *et al.*, 2015). No entanto, dados de segurança sobre seu uso em combinação com outros medicamentos de uso crônico são escassos na literatura e de extrema relevância para o manejo clínico de múltiplas comorbidades.

A dislipidemia, caracterizada pela elevação do colesterol e triglicerídios plasmáticos, é tratada de modo crônico através do uso de fármacos conhecidos como estatinas, dentre eles a sinvastatina, cujo mecanismo de ação consiste na inibição competitiva da 3-hidroxi-2-metil-glutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase tendo atividade hipolipemiante (TODD, GOA, 1990). A sinvastatina é disponibilizada gratuitamente para os pacientes do SUS e também comercializada como medicamento genérico sendo, portanto, um dos fármacos de uso crônico mais utilizados pela população brasileira (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). Revisão clássica publicada por Todd e Goa (1990) informa que a sinvastatina é bem tolerada a curto e médio prazo apresentando leves e transitórios efeitos adversos em poucos pacientes, que se manifestam com distúrbios gastrintestinais, dores de cabeça, fadiga e erupções cutâneas. Alterações das enzimas hepáticas são mais raras e transitórias, mas podem acometer, de forma persistente, de 1 a 2% dos pacientes necessitando suspender o uso do fármaco.

A metformina, uma biguanida sintética, é atualmente um dos medicamentos mais recomendados para o tratamento do diabetes *mellitus* tipo 2 em todo o mundo (MARKOWICZ-PIASECKA, 2017). Atua promovendo a redução da produção hepática de glicose (gliconeogênese) e a maior utilização da glicose pelos músculos, diminuindo a resistência à insulina. Seus efeitos colaterais gastrointestinais são contornados com a apresentação do fármaco em liberação prolongada – a metformina XR, e tem como benefícios adicionais a melhora do perfil lipídico e a diminuição do peso, favorecendo ainda mais sua prescrição e aceitação (SBD, 2019). Embora seja o fármaco de primeira escolha no tratamento da DM2, os pacientes em uso de metformina estão sob risco aumentado de acidose láctica associada à metformina (*metformin-associated lactic acidosis* – MALA), risco que pode ser ainda maior quando a metformina é utilizada com outros fármacos, a exemplo do topiramato, dentre outras condições (FILIPPATOS, 2017; SCHEEN, 2017).

Em muitas circunstâncias, a polifarmácia é inevitável. Deste modo, o conhecimento da ação tóxica dos fármacos sobre determinados órgãos ou sistemas e o possível aumento da toxicidade em situações de uso de múltiplos fármacos são essenciais para o uso mais seguro destas substâncias, a fim de prevenir e minimizar interações medicamentosas adversas. Os estudos em animais são importantes instrumentos na investigação do potencial tóxico de

fármacos e associações, sinalizando os alvos mais sensíveis no organismo e direcionando estudos mais abrangentes e elucidativos.

Considerando a ocorrência frequente de depressão na população e a associação desta com a presença de distúrbios crônico-degenerativos como hipertensão, diabetes e dislipidemia favorecendo a condição de polifarmácia, o objetivo deste estudo foi analisar o efeito do uso concomitante da agomelatina com fármacos amplamente utilizados pela população mundial – losartana, sinvastatina e metformina – sobre parâmetros hematológicos, bioquímicos e histopatológicos de ratos *Wistar* machos e fêmeas após tratamento subcrônico. Hipotetizamos que o perfil tóxico da agomelatina pode ser significativamente alterado por sua combinação com esses medicamentos de uso crônico, destacando os cuidados necessários com a polifarmácia.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Analisar o efeito da associação da agomelatina com losartana, sinvastatina e metformina sobre parâmetros fisiológicos de ratos *Wistar* machos e fêmeas, após tratamento subcrônico, e a interferência das associações no perfil antidepressivo da agomelatina.

2.2 Específicos

- Analisar os parâmetros hematológicos de ratos *Wistar* após o uso subcrônico da agomelatina isolada ou em associações;
- Avaliar o efeito do uso subcrônico da agomelatina isolada ou em associações no metabolismo dos animais através da análise dos parâmetros bioquímicos;
- Verificar o efeito do uso da agomelatina isolada ou em associações sobre os órgãos dos animais através da análise histopatológica de múltiplos órgãos (fígado, rins, estômago, intestino, baço, pâncreas e coração) pós-tratamento subcrônico;
- Comparar o efeito do uso subcrônico da agomelatina isolada ou em associações sobre os parâmetros hematológicos, bioquímicos e histopatológicos entre sexos;
- Verificar a influência das associações de fármacos no efeito antidepressivo da agomelatina.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Farmacoterapia, polifarmácia e segurança do paciente

A humanidade, desde sempre, buscou alívio para dores e cura de doenças, mesmo que de forma empírica. Os primeiros medicamentos vieram da observação dos efeitos de plantas após a sua ingestão por animais. Assim, ao longo do tempo, drogas importantes foram descobertas sem o conhecimento de seu mecanismo ou local de ação. Embora essa abordagem ainda seja útil, a exemplo da triagem de produtos naturais na capacidade de eliminar micro-organismos ou células malignas, a pesquisa dos fármacos modernos geralmente segue a abordagem diferente, partindo da hipótese de que uma determinada proteína ou via desempenha um papel crítico na patogênese de certa doença e que, alterando a atividade desta proteína ou via, uma molécula seria eficaz contra essa doença (RIVERA; GILMAN, 2012).

Atualmente, o desenvolvimento de fármacos segue etapas rigorosas e importantes para garantir não apenas sua eficácia, mas também sua segurança. Antes de serem utilizados em humanos, os potenciais medicamentos são testados quanto à toxicidade geral, através do monitoramento de sua atividade sobre vários sistemas em diferentes espécies de animais por longos períodos de tempo, consistindo esta etapa em ensaios pré-clínicos. As moléculas com potencial terapêutico são também avaliadas quanto à carcinogenicidade, genotoxicidade e toxicidade reprodutiva. Os animais, em geral uma espécie de roedores e uma espécie de não roedores, são usados para grande parte desses testes, embora o valor preditivo dos resultados obtidos em espécies não humanas certamente não seja perfeito. Ensaios *in vitro* e *ex vivo* são utilizados sempre que possível, tanto para poupar os animais quanto para minimizar os custos (RIVERA; GILMAN, 2012).

Após os ensaios pré-clínicos, segue-se a etapa de ensaios clínicos, que consiste na investigação em seres humanos com o objetivo de adquirir informações sobre as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas de um medicamento em potencial. Dependendo da natureza e fase da pesquisa, o ensaio clínico pode ser delineado para avaliar o fármaco quanto a segurança, eficácia, tolerabilidade ou prevenção de condições específicas em determinados grupos de pacientes (RIVERA; GILMAN, 2012).

Embora cercados de todos os cuidados até que tenham sua eficácia e segurança comprovadas e entrem em uso pela população, os fármacos apresentam potencial tóxico inerente e precisam ser avaliados com frequência, em especial se passam a ser utilizados em

condições diferentes daquelas observadas nos ensaios pré-clínicos e clínicos, tal como quando utilizados em associações com outros medicamentos (RIVERA; GILMAN, 2012).

Com o aumento da expectativa de vida da população mundial, tem-se observado a maior incidência e prevalência de doenças crônicas degenerativas, bem como de depressão crônica levando, de modo cada vez mais frequente, à maior utilização simultânea de múltiplos medicamentos, situação conhecida como polifarmácia (CADOGAN, RYAN, HUGHES, 2016; McGRATH *et al.*, 2017).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define polifarmácia como sendo o uso rotineiro e concomitante de quatro ou mais medicamentos (com ou sem prescrição médica) por um mesmo paciente (WHO, 2017). Já Kim e Parish (2017) e Machado-Alba e colaboradores (2017) consideram a polifarmácia como a utilização de cinco ou mais fármacos por um paciente. Estima-se que um quinto dos pacientes adultos faça uso de polifarmácia, sendo esta prevalência ainda maior em idosos, variando de 30% a 70%, chegando a 90% naqueles que moram em asilos (MACHADO-ALBA *et al.*, 2017).

Embora não haja um consenso absoluto sobre a quantidade de fármacos que caracteriza a polifarmácia, esta é frequentemente indicada e clinicamente benéfica em condições específicas, a exemplo de pacientes com doenças crônicas degenerativas cada vez mais prevalentes na população adulta mundial como diabetes *mellitus*, hipertensão e dislipidemia, bem como em pacientes com diferentes comorbidades, incluindo depressão crônica. No entanto, o uso de vários medicamentos acarreta riscos à segurança dos pacientes visto a possibilidade de ocorrência de interações medicamentosas (CADOGAN, RYAN, HUGHES, 2016).

De acordo com Almeida e colaboradores (2007), “o potencial para o desenvolvimento de interações medicamentosas aumenta com a idade, com o número de medicamentos em uso e com o número de médicos que cuidam de um mesmo paciente”. Os autores relatam que o potencial de interação medicamentosa chega a 100% quando o número de fármacos chega a oito.

Mais recentemente, a polifarmácia foi identificada como fator de risco para subprescrição, de modo que pacientes podem não receber os medicamentos necessários à sua situação clínica, pelo fato de os médicos estarem relutantes em prescrever os fármacos necessários para pacientes que já estão recebendo “muitos” medicamentos. Este fator, relacionado a conotações negativas relativas ao termo polifarmácia, pode também representar riscos para a segurança e a qualidade de vida dos pacientes. Portanto, a polifarmácia configura um dos maiores desafios da prescrição médica (CADOGAN, RYAN, HUGHES, 2016).

Para Cadogan e colaboradores (2016), garantir que a prescrição médica seja baseada em evidências é um dos principais desafios para a polifarmácia segura, particularmente em pacientes com várias comorbidades e em idosos. Os autores ressaltam, no entanto, que evidências para embasar prescrições em polifarmácia são escassas, com um número pouco representativo de ensaios clínicos. Ademais, diretrizes de prescrição geralmente são focadas em doenças de modo isolado, não fornecendo orientações sobre como priorizar as recomendações de tratamento frente a múltiplas comorbidades e, deste modo, servir como guia para polifarmácia (HUGHES, McMURDO, GUTHRIE, 2013; TANNENBAUM, SHHEHAN, 2014; CADOGAN, RYAN, HUGHES, 2016).

A consequência da polifarmácia descritas por Kim e Parish (2017) é, principalmente, a ocorrência de efeitos adversos a medicamentos, particularmente devido a interações entre fármacos, comumente levando pacientes a consultas e até internações, implicando em custos. Na medida em que se conhece potenciais interações medicamentosas e suas consequências, estas são consideradas como causas evitáveis relacionadas a internações (JUURLINK *et al.*, 2003; LEENDERTSE *et al.*, 2008). Page e colaboradores (2019) relatam exemplos de desfechos clínicos negativos em pacientes idosos em tratamento com polifarmácia que incluem: deficiências nutricionais, queda, fragilidade, cognição prejudicada, hospitalização mais frequente e mortalidade prematura.

As interações medicamentosas (IM) podem ser classificadas como interações farmacocinéticas ou farmacodinâmicas. As IM farmacocinéticas resultam em alterações nas taxas e velocidade de absorção dos fármacos, nas taxas de ligação às proteínas plasmáticas e/ou de biotransformação ou excreção de um ou ambos os compostos que interagem. A indução ou inibição do metabolismo de medicamentos pelas proteínas do citocromo P450 (CYP - superfamília de proteínas responsáveis pela biotransformação hepática dos fármacos) estão entre as interações medicamentosas clinicamente mais desafiadoras, em especial nos pacientes em polifarmácia. Várias enzimas com especificidades distintas, mas com sobreposição de substrato, são amplamente reconhecidas e clinicamente relevantes para o metabolismo de medicamentos: CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C10, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4, CYP3A5, dentre outras. Os medicamentos que interagem com o sistema citocromo P450 podem ser classificados como inibidores ou indutores. Os inibidores podem ainda ser caracterizados como fracos, moderados ou potentes (OSTERHOUDT; PENNING 2012; SPINA, TRIFIRO, CARACI, 2012; TANNENBAUM, SHHEHAN, 2014;).

A farmacodinâmica de um medicamento pode ser alterada por concorrência pelos receptores e outros alvos não receptores, podendo ocorrer, por exemplo, quando duas drogas

têm ações semelhantes através de diferentes mecanismos celulares. As IM farmacodinâmicas podem resultar em adição, sinergismo, potencialização ou antagonismo dos efeitos de um ou ambos os fármacos envolvidos. Diz-se que uma IM é aditiva quando o efeito combinado de dois medicamentos é igual à soma dos efeitos de cada agente administrado isoladamente. Um efeito sinérgico é aquele em que o efeito combinado excede a soma dos efeitos de cada medicamento administrado isoladamente. Potencialização descreve a origem de um efeito tóxico de um fármaco devido à presença e outro. O antagonismo refere-se à interferência de um medicamento na ação de outro (OSTERHOUDT; PENNING 2012; SPINA, TRIFIRO, CARACI, 2012).

Assim, o conhecimento sobre os fármacos, desde a sua concepção e compreensão de sua farmacocinética e farmacodinâmica, bem como de seu potencial tóxico, são a base da farmacoterapia, sendo essenciais à segurança do paciente e ao sucesso do tratamento. No entanto, o grande número de fármacos disponíveis e a constante necessidade do manejo de comorbidades através do uso simultâneo de vários medicamentos são aspectos desafiadores às prescrições, havendo necessidade de investigações constantes relativas aos potenciais efeitos da associação de fármacos, que podem mudar em diferentes contextos (TANNENBAUM, SHHEHAN, 2014).

3.2 Avaliação da toxicidade de substâncias: testes de toxicidade subcrônica - OECD, Teste 408

A Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (*Organisation for Economic Co-operation and Development* – OECD) é uma entidade internacional, reconhecida mundialmente, que disponibiliza diversas orientações para testes com substâncias químicas, incluindo fármacos. São mais 150 métodos de testes, dentre os mais relevantes, acordados internacionalmente, que são utilizados por órgãos governamentais, pela indústria e por laboratórios independentes para identificar e caracterizar riscos potenciais de produtos químicos (OECD, 2018).

Em seu *Guidelines for the testing of chemicals, Section 4*, encontra-se o Teste 408, que orienta sobre o estudo de toxicidade oral de 90 dias com dose repetida em roedores, sendo este período considerado um tratamento subcrônico (OECD, 2018).

Este método fornece informações sobre riscos para a saúde que podem surgir da exposição à substância em teste via administração oral. O protocolo baseia-se na administração oral repetida da substância de interesse durante um período prolongado (dose diária durante 90

dias), destinando-se ao estudo em roedores, preferencialmente ratos. De acordo com o protocolo, deve-se utilizar pelo menos 20 animais (10 fêmeas e 10 machos) em cada grupo de teste e três concentrações da substância testada. O composto em teste deve ser administrado por gavagem, via dieta ou água potável. Os resultados deste estudo devem incluir: medições (pesando pelo menos uma vez por semana e verificação do consumo de alimentos e água) e observações diárias e detalhadas (exame oftalmológico, hematologia, bioquímica clínica e exame de urina) de preferência no mesmo horário; bem como necropsia e histopatologia. Parâmetros relacionados ao sistema endócrino, em particular sobre a função tireoidiana, são também relevantes.

3.2.1 Análises hematológicas e bioquímicas

De acordo com protocolo de avaliação da toxicidade subcrônica da OECD (2018), os exames hematológicos, que podem ser conduzidos durante o tratamento, e devem, necessariamente, ser realizados ao final do período de teste, devem constar de: contagem de eritrócitos, concentração de hemoglobina, hematócrito, contagem de reticulócitos, contagem total e diferencial de leucócitos, contagem de plaquetas e tempo de coagulação.

Relativo às análises bioquímicas, os parâmetros devem visar à investigação dos principais efeitos tóxicos nos tecidos, especificamente, sobre rins e fígado. Assim, o protocolo da OECD (2018) recomenda a realização (ao longo do período de tratamento e/ou afinal do tratamento) dos seguintes exames bioquímicos: sódio, potássio, glicose, colesterol total, lipoproteína de alta densidade (*high density lipoprotein* – HDL), lipoproteína de baixa densidade (*low density lipoprotein* – LDL), ureia, nitrogênio da uréia no sangue, creatinina, proteína total e albumina e mais de duas enzimas indicativas de efeitos hepatocelulares, por exemplo, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina, Gama glutamil transpeptidase (gama GT) e sorbitol desidrogenase. Dosagens de bilirrubina total e direta também podem ser incluídas, dentre outros parâmetros, dependendo da substância testada.

3.2.2 Análises histopatológicas

Para a avaliação da toxicidade subcrônica sobre os tecidos, a OECD (2018) recomenda, inicialmente, a análise macroscópica de vários órgãos, bem como a observação da superfície externa, orifícios e das cavidades corporais por ocasião da necropsia. O peso dos

órgãos deve ser realizado imediatamente após a eutanásia, evitando ressecamento. Dentre os órgãos a serem avaliados macroscopicamente, o protocolo recomenda a investigação em: fígado, rins, suprarrenais, baço, cérebro, coração, ovários, útero, testículos, próstata, epidídimo e vesículas seminais.

Para a análise microscópica, o protocolo (OECD, 2018) recomenda que os órgãos sejam colocados em solução fixadora adequada, devendo ser analisados através de microscopia os seguintes órgãos e tecidos: todas as lesões observadas macroscopicamente, cérebro, medula espinhal, hipófise, tireóide, paratireóide, timo, esôfago, glândulas salivares, estômago, intestinos, fígado, pâncreas, rins, suprarrenais, baço, coração, traqueia e pulmões, aorta, ovários, útero, colo do útero, vagina, testículos, epidídimos, próstata, vesículas seminais, glândula mamária (masculino e feminino), bexiga, vesícula biliar, gânglios linfáticos, nervos periféricos, músculo esquelético e osso, com medula óssea, pele e olhos.

Através da realização destas análises, os testes de toxicidade em tratamento subcrônico fornecem informações sobre os principais efeitos tóxicos, indica os órgãos-alvo e a possibilidade de acúmulo da substância em estudo, podendo fornecer uma estimativa do nível de exposição de efeito adverso não observado (*no-observed-adverse-effect level* - NOAEL), que pode ser usado na seleção de doses para estudos crônicos e para estabelecer critérios de segurança para a exposição humana (OECD, 2018).

3.3 Fármacos do estudo: agomelatina, losartana, sinvastatina e metformina - usos terapêuticos e potenciais tóxicos

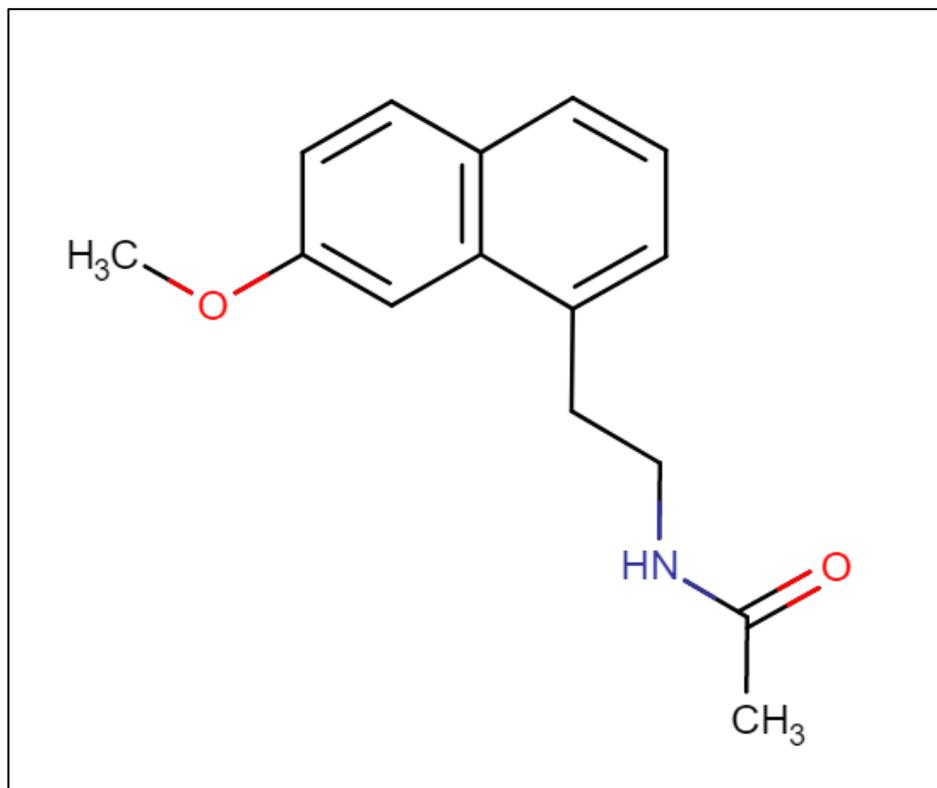
O tratamento de transtornos psiquiátricos crônicos, a exemplo da depressão, e doenças crônico-degenerativas, como hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia e diabetes *mellitus* tipo 2, requer o uso de fármacos de uso contínuo. Dentre os fármacos utilizados para o tratamento da depressão crônica, a agomelatina tem sido uma alternativa recente mundialmente aceita para o manejo desta condição psiquiátrica (SOUTO et al., 2019). Para as doenças crônicas degenerativas supracitadas, a losartana, sinvastatina e metformina são, respectivamente, fármacos amplamente utilizados, há muitos anos, ao redor do mundo (TODD, GOA, 1990; AL-MAJED et al., 2015; MARKOWICZ-PIASECKA, 2017).

3.3.1 Agomelatina

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2020), a depressão é um transtorno mental comum que afeta cerca de 264 milhões de pessoas em todo o mundo com taxas crescentes de prevalência variando de 20% a 25% em mulheres e 7% a 12% em homens (WANG *et al.*, 2017; WHO, 2020). Trata-se de um distúrbio de etiologia multifatorial que acomete indivíduos de diferentes faixas etárias e que tem a farmacoterapia como importante estratégia de tratamento (APA, 2014).

Antidepressivos de várias classes são utilizados na farmacoterapia da depressão, dentre eles, a agomelatina, cujas características lhe conferem um bom perfil de aceitabilidade e segurança (CARVALHO *et al.*, 2016). A agomelatina é composto naftalênico análogo estrutural da melatonina, designado quimicamente como N-[2-(7-metoxi-1-naftil)-etil]acetamida, que atua de forma mista como agonista dos receptores da melatonina (MT₁ e MT₂) e antagonista dos receptores da serotonina (5-HT_{2C}) (Figura 1) (MILLAN, 2005). É considerada como um fármaco com menos efeitos colaterais que outros antidepressivos, resultando, em geral, em boa adesão ao tratamento (STUHEC, 2013). Apresenta eficácia antidepressiva de longo prazo, melhorando também sintomas de ansiedade, anedonia e parâmetros do sono, sendo utilizada na dose de 25mg/dia, podendo chegar a 50mg/dia, (SANSONE, SANSONE, 2011).

Figura 1 – Estrutura molecular da agomelatina – designação química: N-[2-(7-metoxi-1-naftil)-etil]acetamida.



Fonte: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB06594>

A agomelatina tem sido descrita como um medicamento que não induz grave síndrome de abstinência ou disfunção sexual, o que a torna uma alternativa útil para o tratamento de homens sexualmente ativos (MONTGOMERY *et al.*, 2004, MONTEJO *et al.*, 2011; SAPETTI, 2012).

Apesar de suas vantagens, a agomelatina tem sido frequentemente descrita como um medicamento potencialmente hepatotóxico (CARVALHO *et al.*, 2016; BILLIOTI DE GAGE *et al.*, 2018). Em recente revisão realizada por Souto e colaboradores (2019) sobre o uso da agomelatina em seres humanos, a hepatotoxicidade foi o efeito adverso mais citado e com maior relevância dentre os levantados. A revisão sistemática de Freiesleben e Furczyk (2015) também fornece evidências da existência de uma relação positiva entre o uso de agomelatina e lesão hepática. Outros autores apontam a hepatotoxicidade como importante efeito adverso da agomelatina, colocando-a ao lado de outros três antidepressivos (nefazodona, bupropiona e duloxetina) como principais fármacos desta classe relacionados a efeitos deletérios sobre o fígado (VOICAN *et al.*, 2014; CARVALHO *et al.*, 2016).

A agomelatina é metabolizada pela CYP1A2 (90%) e pela CYP2C9/19 (10%) (DOLDER, NELSON, SNIDER, 2008; SONG *et al.*, 2014; FREIESLEBEN, FURCZYK, 2015.). O fármaco tem, pelo menos, quatro metabólitos, mas nenhum deles tem efeito farmacológico, além de caracterizar-se por não exercer atividade indutora ou inibidora no sistema CYP (SPINA, TRIFIRO, CARACI, 2012; SAIZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2019). No entanto, a polifarmácia, com a utilização de fármacos que interagem com estas isoenzimas, pode diminuir ou aumentar a biodisponibilidade da agomelatina, reduzindo a eficácia do fármaco ou aumentando o risco de lesão hepática, respectivamente (CARVALHO *et al.*, 2016).

Como exemplos de fármacos que apresentam interações farmacocinéticas com a agomelatina, a fluvoxamina, um inibidor potente de CYP1A2 e moderado de CYP2C9, inibe acentuadamente o metabolismo da agomelatina, aumentando em 60 vezes a exposição à agomelatina em sua forma ativa. O uso de fármacos reconhecidos como potentes inibidores de CYP1A2, como ciprofloxacina, amiodarona, mexiletina e zileuton, concomitantes à agomelatina, devem ser evitados. Inibidores moderados de CYP1A2, como estrogênios, também podem aumentar a exposição à agomelatina, devendo ser utilizados com bastante cautela. Por outro lado, o tabagismo reduz de três a quatro vezes as concentrações plasmáticas de agomelatina ao induzir o CYP1A2 (SPINA, TRIFIRO, CARACI, 2012).

O uso da agomelatina por pacientes com doença hepática pré-existente tem sido contraindicado, sendo inclusive relatado caso de insuficiência hepática fulminante em paciente com esteatose hepática prévia (GAHR *et al.*, 2013; GRUZ *et al.*, 2013). Ao mesmo tempo, o monitoramento da função hepática deve ser realizado em pacientes em uso do fármaco, mesmo naqueles sem doença hepática prévia, visto que alguns pacientes apresentam importante elevação das enzimas hepáticas, o que pode implicar na descontinuação do tratamento (STUHEC, 2013; VOICAN *et al.*, 2014).

Embora a agomelatina esteja sendo bastante utilizada mundialmente, é necessária a obtenção de mais informação sobre a segurança e eficácia deste fármaco no contexto da polifarmácia.

3.3.2 Losartana

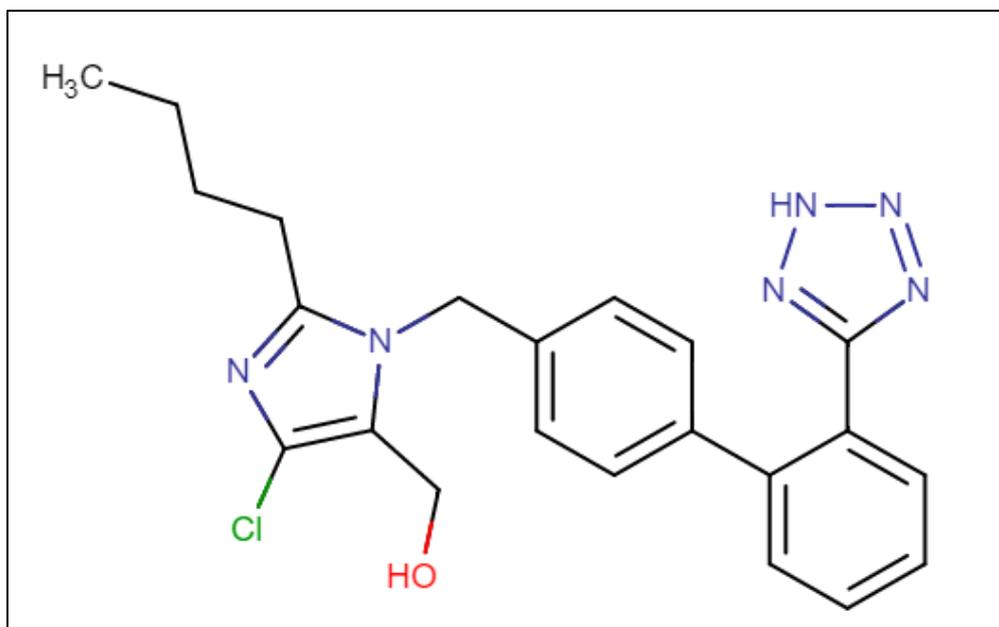
Dentre as doenças crônicas degenerativas mais prevalentes na população mundial figura a hipertensão arterial sistêmica (HAS). Atualmente, a HAS é definida como sendo a condição em que o valor da pressão arterial (PA) sistólica aferida em consultório é maior ou igual a 140 mmHg e/ou o valor de PA diastólica maior ou igual a 90 mmHg (WILLIAN *et al.*,

2018; SBC, 2019;). Com base nesta definição, a prevalência global de HAS em 2015 foi de 1,13 bilhões de indivíduos acometidos, afetando todas as classes sociais indistintamente em países desenvolvidos ou em desenvolvimento (WILLIAN *et al.*, 2018).

O manejo farmacológico da HAS é feito através do uso contínuo de fármacos anti-hipertensivos pertencentes a diversas classes. Dentre estas, encontra-se a classe dos antagonistas dos receptores da angiotensina II (ARA-II), que atuam através do bloqueio seletivo dos receptores AT1, a exemplo da losartana (Figura 2) (AL-MAJED *et al.*, 2015; SBC, 2019; WILLIAN *et al.*, 2018).

A losartana é usada no controle da hipertensão e insuficiência cardíaca, particularmente em pacientes que desenvolvem tosse com inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA). Também é usada para reduzir o risco de acidente vascular cerebral em pacientes com hipertrofia ventricular esquerda e no tratamento da nefropatia diabética. É administrado por via oral como sal de potássio na dose usual de 50mg uma vez por dia, podendo ser aumentada, se necessário, para 100mg por dia em dose única ou em duas doses divididas (AL-MAJED *et al.*, 2015).

Figura 2 – Estrutura molecular da losartana – designação química: 2-butyl-4-chloro-1-[[2'-(2H-tetrazol-5-yl)[1,1'-biphenyl]-4-yl]methyl]-1H-imidazole-5-methanol; 2-n-butyl-4-chloro-5-hydroxymethyl-1-[[2'-(1H-tetrazol-5-yl)biphenyl-4-yl]methyl]imidazole; 2-butyl-4-chloro-1-[p-(o-1H-tetrazol-5-yl)phenyl]benzyl]imidazole-5-methanol.



Fonte: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00678>

Losartana pode ser metabolizada pelos CYP3A4, CYP2C9 e CYP2C10. No geral, é considerado um fármaco com baixo perfil de interação, com poucas interações clinicamente relevantes com fármacos inibidores e estimuladores do sistema CYP450 (SICA, GEHR, GHOSH, 2005).

De acordo com Sica, Gehr e Ghosh (2005) e Al-Majed e colaboradores (2015), losartan, assim como outros ARAs, é um composto desprovido de efeitos adversos significativos. Embora pouco frequentes, os efeitos adversos descritos associados ao uso de losartana são: diminuição das taxas de hemoglobina e hematócrito, disgeusia (diminuição ou alteração do paladar), enxaqueca abrupta, psicose aguda, alucinações visuais, delírios paranóicos, insuficiência hepática e alterações eletrolíticas (SICA, GEHR, GHOSH, 2005).

Não obstante a literatura relate poucos e infrequentes efeitos adversos, baixa toxicidade e baixo perfil de interação da losartana, a investigação de possíveis sistemas orgânicos susceptíveis ao fármaco, especialmente em condições de polifarmácia, é de especial importância, dada a ampla utilização mundial do fármaco.

3.3.3 Sinvastatina

De acordo com a Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC), a dislipidemia consiste em alterações das frações lipídicas biologicamente relevantes do organismo, podendo ter etiologia primária (de origem genética) ou secundária (decorrente de estilo de vida inadequado, de certas condições mórbidas, ou do uso de medicamentos), constituindo-se um importante fator de risco modificável para doenças cardiovasculares (SBC, 2019). Com base nas estimativas globais da OMS (WHO, 2014), as dislipidemias causam um terço das cardiopatias isquêmicas e um quinto das doenças cerebrovasculares em todo o mundo, culminando em cerca de 2,6 milhões de mortes por ano.

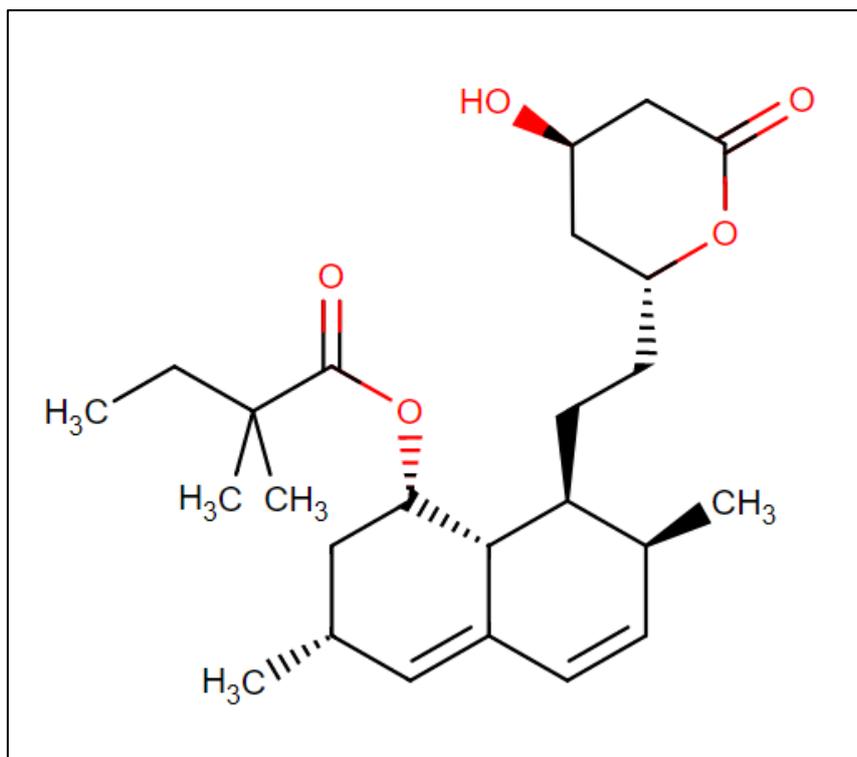
As dislipidemias podem ser classificadas de acordo com a(s) fração(ões) lipídica(s) alterada(s), podendo apresentar-se como: *i*) hipercolesterolemia isolada, com o aumento isolado da lipoproteína de baixa densidade rica em colesterol – LDL-c ($\text{LDL-c} \geq 160 \text{ mg/dL}$); *ii*) hipertrigliceridemia isolada, quando há aumento isolado dos triglicérides – TG ($\text{TG} \geq 150 \text{ mg/dL}$ ou $\geq 175 \text{ mg/dL}$, se a amostra for obtida sem jejum); *iii*) hiperlipidemia mista, com aumento do LDL-c ($\text{LDL-c} \geq 160 \text{ mg/dL}$) e dos TG ($\text{TG} \geq 150 \text{ mg/dL}$ ou $\geq 175 \text{ mg/dL}$, se a amostra for obtida sem jejum); e *iv*) situação de níveis baixos de lipoproteína de alta densidade – HDL-c (homens $< 40 \text{ mg/dL}$ e mulheres $< 50 \text{ mg/dL}$) isolada ou em associação ao aumento de LDL-c ou de TG.

A instituição do tratamento farmacológico para o manejo das dislipidemias leva em consideração o risco cardiovascular do paciente e também o tipo de alteração do perfil lipídico presente, pois o tipo de dislipidemia define a escolha da classe terapêutica a ser utilizada (SBC, 2019). A hipercolesterolemia isolada tem sido tratada, há décadas, através do uso de estatinas, dentre elas a sinvastatina (Figura 3), cujo mecanismo de ação consiste na inibição competitiva da 3-hidroxi-2-metil-glutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, tendo atividade hipolipemiante (TODD, GOA, 1990; SBC, 2019).

A sinvastatina é metabolizada no fígado, principalmente pelo CYP3A4, sendo suscetível a interações quando coadministrada com fármacos potencialmente inibidores desta enzima, configurando uma interação farmacocinética (SAITO *et al.*, 2005).

Revisão clássica publicada por Todd e Goa (1990) informa que a sinvastatina é bem tolerada a curto e médio prazo apresentando leves e transitórios efeitos adversos em poucos pacientes, que se manifestam como distúrbios gastrintestinais, dores de cabeça, fadiga e erupções cutâneas. Alterações das enzimas hepáticas são mais raras e transitórias, mas podem acometer, de forma persistente, de 1 a 2% dos pacientes necessitando a suspensão do uso do fármaco (TODD, GOA, 1990; SBC, 2019). No entanto, a SBC (2019) alerta para efeitos sobre a musculatura esquelética, que vão de mialgia a rabdomiólise, considerando-os como efeitos adversos comuns decorrentes do uso das estatinas, mas não apenas da sinvastatina.

Figura 3 – Estrutura molecular da sinvastatina – designação química: [(1S,3R,7S,8S,8aR)-8-[2-[(2R,4R)-4-hydroxy-6-oxooxan-2-yl]ethyl]-3,7-dimethyl-1,2,3,7,8,8a-hexahydronaphthalen-1-yl]2,2-dimethylbutanoate.



Fonte: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00641>

Estando a dislipidemia associada à presença de outras doenças crônicas degenerativas e também à depressão, sendo o uso da sinvastatina bastante comum na farmacoterapia da hipercolesterolemia, estudos que detectem potenciais alvos do organismo que sejam afetados por efeitos tóxicos da sinvastatina ou da interação desta com outros fármacos, são sempre importantes para garantir a segurança do uso do fármaco isolado ou em associações.

3.3.4 Metformina

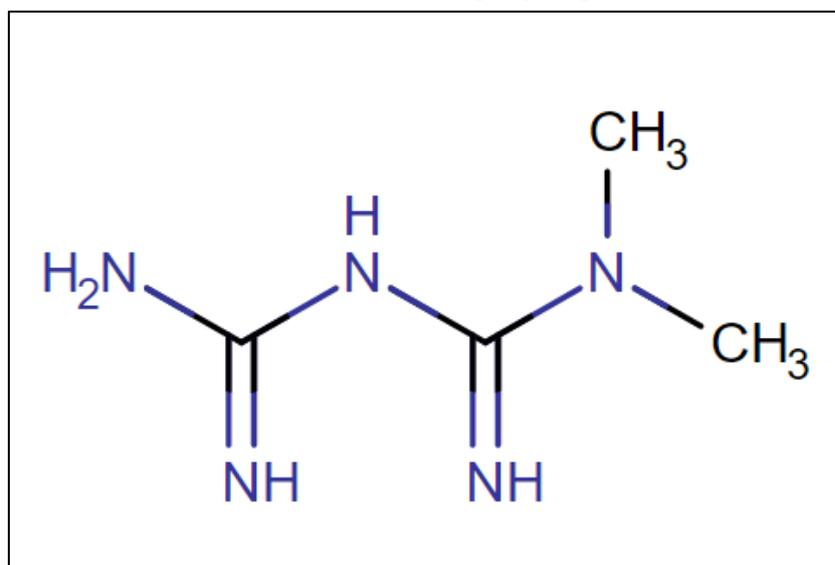
O diabetes *mellitus* (DM) é um distúrbio metabólico que tem como característica a elevação persistente da glicemia como consequência de uma deficiência na produção de insulina ou na sua ação, ou de ambos os mecanismos. O DM atinge proporções epidêmicas, com a estimativa da existência de cerca de 425 milhões de portadores ao redor do mundo, na faixa etária de 20 a 79 anos, ocorrendo em todos os países, independente do grau de desenvolvimento (SBD, 2019).

A deficiência insulínica que ocorre no DM pode ter etiologia autoimune (DM tipo 1) ou multifatorial, incluindo componentes genéticos e ambientais (DM tipo 2), ambas as situações culminando em hiperglicemia persistente que pode ocasionar complicações no organismo a longo prazo. O diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) corresponde de 90 a 95% de todos os casos de DM, geralmente acometendo indivíduos adultos a partir da quarta década de vida (SBD, 2019).

O tratamento farmacológico do DM2 tem como objetivo alcançar e manter a normoglicemia, consistindo no uso de fármacos hipoglicemiantes, também como conhecidos como antidiabéticos, em monoterapia ou combinados, podendo haver a necessidade de insulinoterapia associada em algumas situações (QUAILE *et al.*, 2010; SBD, 2019).

Dentre as várias classes de fármacos hipoglicemiantes existentes, estão as biguanidas, a exemplo da metformina (Figura 4) que é, mundialmente, o fármaco de primeira escolha para o tratamento do DM2 (QUAILE, 2010; MARKOWICZ-PIASECKA, 2017). De acordo com a Sociedade Brasileira de Diabetes, para pacientes com diagnóstico recente de DM2 e que não atingem a normoglicemia apenas com controle alimentar e prática de atividade física, o início do tratamento farmacológico consiste no uso de metformina, aliado às modificações no estilo de vida (SBD, 2019).

Figura 4 – Estrutura molecular da metformina – designação química: 1,1-dimethylguanidine.



Fonte: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00331>

A metformina é administrada por via oral e, embora seu mecanismo de ação responsável pela redução da glicemia não seja completamente elucidado, é reconhecidamente

um fármaco que diminui a produção de glicose e melhora a sensibilidade à insulina aumentando captação e utilização periférica de glicose (QUAILE, 2010).

Estudos farmacocinéticos demonstram que a metformina não é metabolizada no organismo humano, não tendo sido encontrados metabólitos deste fármaco após seu uso. É, portanto, excretada inalterada na urina ou pela via biliar, não sofrendo metabolismo hepático (QUAILE, 2010; MARKOWICZ-PIASECKA, 2017).

Os pacientes em uso de metformina podem apresentar as seguintes reações adversas: náuseas, pirose, vômitos, diarreia, gosto metálico na boca, perda de apetite, diminuição da absorção de vitamina B12, e, com menor incidência, acidose láctica associada à metformina (*metformin-associated lactic acidosis* – MALA), que ocorre de forma mais frequente e grave em idosos e pacientes com insuficiência renal. No entanto, a metformina é, em geral, bem tolerada, uma vez que os efeitos adversos ocorrem com mais frequência no início da terapia e resolvem-se espontaneamente na maioria dos casos (MARKOWICZ-PIASECKA, 2017).

Apesar da metformina estar no mercado há muitos anos, estudos experimentais podem ajudar a elucidar aspectos relativos à toxicidade do fármaco sobre o organismo, em particular, quando associado a outros fármacos de uso contínuo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo experimental adotado neste estudo consistiu em uma adaptação das recomendações do *OECD Guideline for the Testing of Chemicals – Section 4 -Test 408* (OECD, 2018).

4.1 Local

O trabalho foi realizado no biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia (DFF) e no Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM), da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC).

4.2 Animais e grupos experimentais

O projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFC obtendo certificado de autorização sob número 57/2016 (ANEXO A) e os experimentos foram conduzidos de acordo com o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (NRC, 2011). Todos os esforços foram feitos para reduzir o número de animais utilizados e minimizar o sofrimento destes.

Foram utilizados 120 *Rattus norvegicus* da linhagem *Wistar*, de ambos os sexos (60 machos e 60 fêmeas), com seis semanas de vida, pesando entre 200 e 250g, provenientes do Biotério Central da UFC. Os animais ficaram alojados no biotério do DFF em caixas de polipropileno medindo 42 x 25 x 20cm, agrupados por sexo em número de 6 animais/caixa, com alimento (FRI-LAB Ratos II, FRI-Ribe) e água *ad libitum*, mantidos em temperatura controlada ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e em ciclo claro/escuro de 12h.

O experimento ocorreu em duas etapas, sendo a primeira conduzida com os animais fêmeas (n=60) e a segunda com os machos (n=60). Em cada etapa, os animais foram aleatoriamente divididos em 10 grupos de seis animais por gaiola. Assim, foram formados os seguintes grupos experimentais (Tabela 1):

Tabela 1 – Identificação e composição dos grupos experimentais.

Grupos	Siglas	Tratamentos (via oral, 1x/dia, 90 dias)	Etapa 1- fêmeas (n)	Etapa 2- machos (n)	Total de animais (n)
1	G1/SAL	salina	06	06	12
2	G2/AGO	agomelatina (2,27mg/kg)	06	06	12
3	G3/LOS	losartana (4,61mg/kg)	06	06	12
4	G4/SIN	sinvastatina (1,83mg/kg)	06	06	12
5	G5/MET	metformina (78,66mg/kg)	06	06	12
6	G6/LSM	losartana (4,61mg/kg) + sinvastatina (1,83mg/kg) + metformina (78,66mg/kg)	06	06	12
7	G7/AL	agomelatina (2,27mg/kg) + losartana (4,61mg/kg)	06	06	12
8	G8/AS	agomelatina (2,27mg/kg) + sinvastatina (1,83mg/kg)	06	06	12
9	G9/AM	agomelatina (2,27mg/kg) + metformina (78,66mg/kg)	06	06	12
10	G10/ALMS	agomelatina (2,27mg/kg) + losartana (4,61mg/kg) + sinvastatina (1,83mg/kg) + metformina (78,66mg/kg)	06	06	12
Total de animais			60	60	120

Fonte: elaborada pelo autor.

4.3 Fármacos, doses e protocolo de tratamento

O tratamento constituiu-se na administração via oral, por gavagem, do fármaco ou associações de fármacos objetos da pesquisa durante 90 dias consecutivos (tratamento subcrônico), sempre no mesmo horário – período da manhã. Os animais não foram mantidos em jejum antes da administração dos tratamentos. Foram utilizados os seguintes fármacos: agomelatina 25 mg (Valdoxan®, laboratório Servier do Brasil), losartana potássica 50mg (Cozaar®, laboratório Merck Sharp & Dohme, Brasil), sinvastatina 20mg (Zocor® laboratório Merck Sharp & Dohme, Brasil), cloridrato de metformina 850mg (Glifage® laboratório Merck, Brasil).

Foram preparadas as seguintes doses para administração nos animais: agomelatina – 2,27mg/kg, losartana – 4,61mg/kg, sinvastatina – 1,83mg/kg e metformina – 78,66mg/kg levando em consideração a conversão das doses de humanos para outras espécies, de acordo com a tabela 2, proposta por Nair & Jacob (2016) e conforme os cálculos apresentados:

Tabela 2 – Conversão de doses entre humanos e ratos.

Espécie	Peso corporal de referência (kg)	Faixa de peso (kg)	Superfície corporal (m ²)	Para converter a dose de mg/kg para mg/m ² , multiplicar pelo fator de correção K _m	Para converter a dose animal equivalente (DAE) em mg/kg em dose humana equivalente (DHE) e vice-versa	
					Dividir a dose animal por (K _m ratio)	Multiplicar a dose animal por (K _m ratio)
Humano	60	-	1,62	37	-	-
Rato	0,15	0,08-0,27	0,025	6	6,2	0,16
Ferret	0,30	0,16-0,54	0,043	7	5,3	0,18

Fonte: NAIR & JACOB, 2016 (com adaptações).

Levando em conta que os animais do experimento (ratos) começaram o tratamento com média de peso entre 200g e 250g e iriam ganhar peso ao longo dos 90 dias de tratamento, como de fato, chegaram ao final com peso médio de 500g, utilizou-se o fator de correção K_m=7 e o K_m ratio de 0,18, para que a dose calculada contemplasse a faixa de peso de 160g a 540g e superfície corporal correspondente.

Assim, de acordo com Nair & Jacob (2016), o cálculo geral consistiu em:

$$DHE(\text{mg/kg}) = DAE(\text{mg/kg}) \times K_m \text{ ANIMAL} / K_m \text{ HUMANO} \rightarrow DAE(\text{mg/kg}) = DHE(\text{mg/kg}) / (K_m \text{ ANIMAL} / K_m \text{ HUMANO})$$

Onde:

- $DHE(\text{mg/kg}) = \text{dose do fármaco}(\text{mg})/60\text{kg}$ e

- $K_m \text{ ANIMAL} / K_m \text{ HUMANO} = 7/37 = 0,18$

Então: $DAE(\text{mg/kg}) = DHE(\text{mg/kg})/0,18$

Assim, tem-se:

a) Cálculo da dose animal equivalente (DAE) de **agomelatina**:

$$1. \text{DHE(mg/kg)} = \text{dose do fármaco(mg)}/60(\text{kg}) \rightarrow \text{DHE(mg/kg)} = 25\text{mg}/60\text{kg} \rightarrow \text{DHE} = 0,41\text{mg/kg}$$

$$2. \text{DAE(mg/kg)} = \text{DHE(mg/kg)}/0,18 \rightarrow \text{DAE(mg/kg)} = 0,41/0,18 \rightarrow \text{DAE(mg/kg)} = \mathbf{2,27\text{mg/kg}}$$

b) Cálculo da dose animal equivalente (DAE) de **losartana**:

$$1. \text{DHE(mg/kg)} = \text{dose do fármaco(mg)}/60(\text{kg}) \rightarrow \text{DHE(mg/kg)} = 50\text{mg}/60\text{kg} \rightarrow \text{DHE} = 0,83\text{mg/kg}$$

$$2. \text{DAE(mg/kg)} = \text{DHE(mg/kg)}/0,18 \rightarrow \text{DAE(mg/kg)} = 0,83/0,18 \rightarrow \text{DAE(mg/kg)} = \mathbf{4,61\text{mg/kg}}$$

c) Cálculo da dose animal equivalente (DAE) de **sinvastatina**:

$$1. \text{DHE(mg/kg)} = \text{dose do fármaco(mg)}/60(\text{kg}) \rightarrow \text{DHE(mg/kg)} = 20\text{mg}/60\text{kg} \rightarrow \text{DHE} = 0,33\text{mg/kg}$$

$$2. \text{DAE(mg/kg)} = \text{DHE(mg/kg)}/0,18 \rightarrow \text{DAE(mg/kg)} = 0,33/0,18 \rightarrow \text{DAE(mg/kg)} = \mathbf{1,83\text{mg/kg}}$$

d) Cálculo da dose animal equivalente (DAE) de **metformina**:

$$1. \text{DHE(mg/kg)} = \text{dose do fármaco(mg)}/60(\text{kg}) \rightarrow \text{DHE(mg/kg)} = 850\text{mg}/60\text{kg} \rightarrow \text{DHE} = 14,16\text{mg/kg}$$

$$2. \text{DAE(mg/kg)} = \text{DHE(mg/kg)}/0,18 \rightarrow \text{DAE(mg/kg)} = 14,16/0,18 \rightarrow \text{DAE(mg/kg)} = \mathbf{78,66\text{mg/kg}}$$

Os comprimidos foram triturados e dissolvidos em água em volume suficiente para a obtenção da dose desejada de cada fármaco para administração via oral por gavagem. Durante a gavagem, as medicações foram introduzidas, através da cavidade oral, no aparelho digestório dos animais. Para o procedimento, foi utilizado um tubo flexível de 8cm de comprimento, curvado e com a ponta arredondada, que fora introduzido na boca do animal e gentilmente empurrado pelo esôfago até o estômago, com cautela para assegurar que o tubo não penetrasse inadvertidamente na traqueia. Foi administrado o volume de 1ml da solução de cada medicamento para cada 100g de peso corporal do animal.

Após os 90 dias de tratamento, os animais foram anestesiados com Xylazina 10mg/Kg e Cetamina 90mg/Kg, ambos por via intramuscular, administrados em volume de 0,3ml, dando-se preferência aos músculos de grande superfície, com a utilização de agulhas de 25x5 ou 25x7mm.

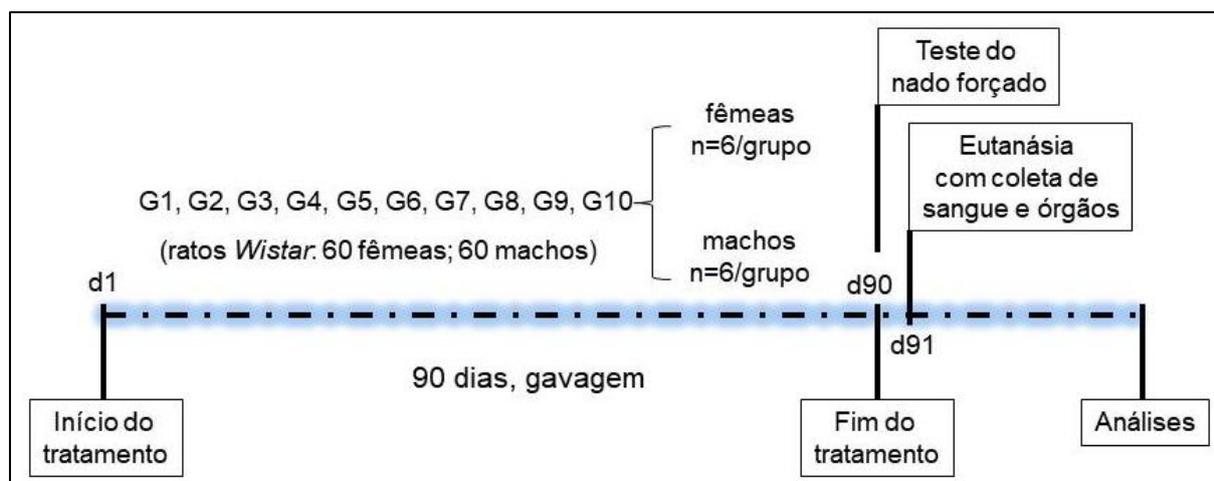
Estando os animais anestesiados e inconscientes, foi então efetuada a coleta de sangue através de punção a partir da aorta abdominal. A quantidade de sangue extraída foi de 3 a 5ml, sendo o volume obtido separado em tubos específicos para serem destinados às análises bioquímicas (tubos sem anticoagulante e com acelerador de coágulo) e hematológicas (tubo com ácido etilenodiamino tetra acético – EDTA – sódico a 10%).

Imediatamente após a coleta do sangue, foi feita a remoção dos seguintes órgãos para estudo histopatológico: fígado, rins, estômago, intestino, baço, pâncreas e coração. Os órgãos foram pesados antes de serem colocados no fixador, sendo então acondicionados em tubos contendo formol a 10% ou álcool.

4.4 Linha do tempo

A Figura 5 ilustra a linha do tempo do trabalho desenvolvido.

Figura 5 – Linha do tempo referente ao tratamento subcrônico de ratos *Wistar* com agomelatina, losartana, sinvastatina e metformina isolados ou em associações.



Legenda: d: dia de tratamento; n: número de animais; G: grupo experimental; G1: controle salina; G2: agomelatina; G3: losartana; G4: sinvastatina; G5: metformina; G6: losartana + sinvastatina + metformina; G7: agomelatina + losartana; G8: agomelatina + sinvastatina; G9: agomelatina + metformina; G10: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina.

Fonte: elaborada pelo autor.

4.5 Análises hematológicas

O sangue dos animais coletado em tubos contendo EDTA sódico a 10% foi imediatamente encaminhado para o Laboratório de Toxicologia e Exames Laboratoriais do NPDM, onde foi utilizado o aparelho SDH-3 VET (Labtest, Brasil) para a realização do hemograma. Assim, a avaliação hematológica consistiu na realização de hemograma completo automatizado contemplando os seguintes parâmetros: leucócitos totais, linfócitos (absolutos e %), monócitos/eosinófilos/basófilos (absolutos e %), granulócitos (absolutos e %), eritrócitos, hemoglobina (HGB), hematócrito (HCT), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM), índice de anisocitose (RDW) e contagem de plaquetas (PLT).

4.6 Análises bioquímicas

O sangue coletado em tubos contendo acelerador de coagulação foi centrifugado a 3500rpm, por 10 minutos, para obtenção do soro, o qual foi separado em tubos tipo *ependorf* para posterior análise bioquímica no analisador automático Labmax Pleno, modelo standard (Labtest, Brasil). Os exames foram realizados no Laboratório de Toxicologia e Exames Laboratoriais do NPDM segundo os protocolos do fabricante do equipamento e dos kits

reagentes para cada parâmetro a ser avaliado. Foram analisados os seguintes parâmetros bioquímicos: colesterol total, triglicérides, bilirrubina total, bilirrubina direta, fosfatase alcalina, Gama glutamil transpeptidase (gama GT), alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), glicose, ureia e creatinina.

4.7 Análises histopatológicas

Os órgãos foram pesados logo após terem sido retirados dos animais eutanasiados, antes de serem colocados na solução fixadora e submetidos às análises histopatológicas.

As análises histopatológicas foram realizadas no Laboratório de Histopatologia do NPDM. Os órgãos (fígado, rins, estômago, intestino, baço, pâncreas e coração), fixados em formol a 10% ou em álcool, foram analisados macroscopicamente e, posteriormente, submetidos ao processamento histológico através do sistema automatizado PT05 Lupetec® passando por desidratação em série alcoólica crescente, diafanização em xilol, impregnação em parafina, fundição a 60°C e inclusão dos espécimes formando blocos parafinados à temperatura ambiente. Os fragmentos foram seccionados com 5µm de espessura e corados pela coloração hematoxilina-eosina (HE). A hematoxilina se liga aos componentes basofílicos que se coram em violeta, enquanto a eosina liga-se principalmente às estruturas acidófilas e eosinófilas corando o citoplasma em rosa.

As lâminas foram analisadas, de modo cego, ao microscópio óptico (Olympus CX 31), em objetivas de 40 e 100X, por dois experientes patologistas, para verificação das estruturas/alterações microscópicas em cada órgão específico, considerando os aspectos descritos na Tabela 3. Os resultados foram apresentados de forma descritiva, sendo os mais relevantes documentados através de fotomicrografias em aumento de 200 ou 400X (microscópio óptico Olympus CX 31 e máquina fotográfica Nikon CoolPix 10x Wide Optical).

Tabela 3 – Aspectos histopatológicos avaliados por órgão.

Fígado	Intestino
Tumefação celular de hepatócitos Degeneração hidrópica Hiperplasia das células de Kupffer Focos inflamatórios Esteatose macro ou microvesicular Necrose focal de hepatócitos	Achatamento dos vilos Perda das criptas Focos inflamatórios Vacuolização ou edema dos enterócitos Folículos linfóides Vasos ectásicos
Rim	Baço
Tumefação do epitélio tubular Vacuolização do epitélio tubular Necrose ou descamação do epitélio tubular Cilindros hialinos Focos inflamatórios	Presença de hemossiderina e/ou lipofuscina Presença de megacariócitos
	Pâncreas
	Vacuolização acinar Necrose acinar Inflamação e hiperplasia linfonodal
Estômago	Coração
Focos inflamatórios	Focos inflamatórios
Pulmão	
Focos inflamatórios Vasos ectásicos Edema	

Fonte: elaborada pelo autor.

4.8 Teste do nado forçado

O teste do nado forçado consiste em um teste comportamental empregado na avaliação da atividade antidepressiva de fármacos, no qual roedores (ratos ou camundongos) são expostos a um estímulo estressor, sendo colocados, individualmente, em um tanque cilíndrico de acrílico com volume de água que os impeça de apoiar as patas no fundo do cilindro e também de fugir através da borda superior do tanque, precisando executar movimentos para não sofrer afogamento – o nado forçado. No início do teste, a tendência natural dos animais é de nadar e procurar fazer movimentos de escalada nas paredes internas do cilindro. Com o

passar do tempo, os animais adotam uma postura de imobilidade. Neste padrão de comportamento, considera-se que, após o período inicial de luta, os animais percebem que não tem rota de fuga no cilindro e desistem de tentar escapar. Animais em estado depressivo tendem a apresentar tempo de imobilidade superior àqueles que não se encontram depressivos, refletindo apatia e desesperança, comuns na depressão. Assim, quanto maior o tempo de imobilidade do animal, maior seu estado depressivo e vice-versa (DETKE, JOHNSON, LUCKI, 1997; LUCKI, 1997).

O teste de nado forçado deste estudo, adaptado de Detke, Johnson e Lucki (1997), foi realizado para avaliar se a atividade antidepressiva da agomelatina foi afetada frente à associação desta com os demais fármacos. Os animais foram submetidos ao teste em cilindros de acrílico transparente, com cerca de 50cm de altura e 20cm de diâmetro, contendo água na profundidade de 30cm e temperatura ambiente. Os testes foram realizados individualmente por 5 minutos com cada animal, imediatamente após o fim dos 90 dias tratamento. O tempo de imobilidade dos animais, correspondendo à completa imobilidade ou à flutuação com realização de movimentos suaves (apenas o suficiente para a manutenção do focinho/cabeça acima da superfície da água), foi registrado por observador treinado através de crômetro.

Ao término do teste, cada animal foi retirado do cilindro e seco com toalha, e retornado, em seguida, para sua respectiva gaiola. Entre um animal e outro, a água do cilindro foi escoada e o cilindro higienizado com álcool a 70%.

4.9 Análise dos dados

Os testes estatísticos foram realizados através do programa GraphPad Prism for Windows 7.04 (San Diego, USA). Os dados das análises hematológicas, bioquímicas, peso dos órgãos dos animais e teste do nado forçado foram submetidos à análise de variância (*two-way* ANOVA), seguida dos testes de significância de Tukey para comparação entre os grupos, e de Dunnett para comparação dos grupos com o controle salina. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

Os resultados das análises histopatológica foram apresentados de forma descritiva, sendo os mais relevantes documentados através de fotomicrografias.

5 RESULTADOS

5.1 Resultados das análises hematológicas

Os parâmetros hematológicos foram analisados separadamente por sexo, comparando-se os grupos experimentais entre si, bem como fazendo a comparação de cada parâmetro entre os sexos. Deste modo, foram avaliados: leucócitos totais, linfócitos (absolutos e percentual %), monócitos/eosinófilos/basófilos (absolutos e percentual %), granulócitos (absolutos e percentual %), eritrócitos, hemoglobina (HGB), hematócrito (HCT), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM) e índice de anisocitose (RDW).

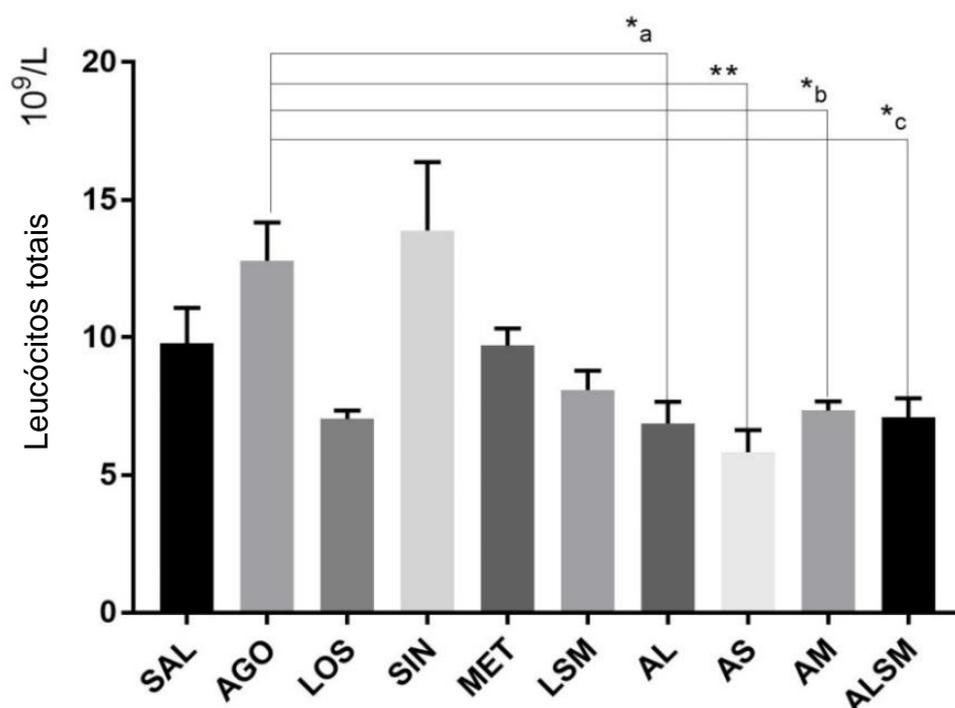
A seguir, serão apresentados os Gráficos e a tabela resultantes das análises de cada parâmetro hematológico por sexo e de cada parâmetro comparado entre sexos, tendo sido considerados como significantes os valores de $p < 0,005$.

5.1.1 Leucócitos totais

5.1.1.1 Fêmeas

A análise dos grupos experimentais comparados entre si mostrou diminuição significativa ($p < 0,05$) no número de leucócitos totais de todas as associações de fármacos com a agomelatina quando comparados em relação à agomelatina usada em monoterapia, mas não em relação ao grupo controle salina, como demonstrado no Gráfico 1.

Gráfico 1 – Resultado da análise do número de leucócitos totais nos animais fêmeas. Comparação do grupo agomelatina usada em monoterapia (AGO) com os grupos de associações da agomelatina com outros fármacos ($n=6$ animais/grupo).

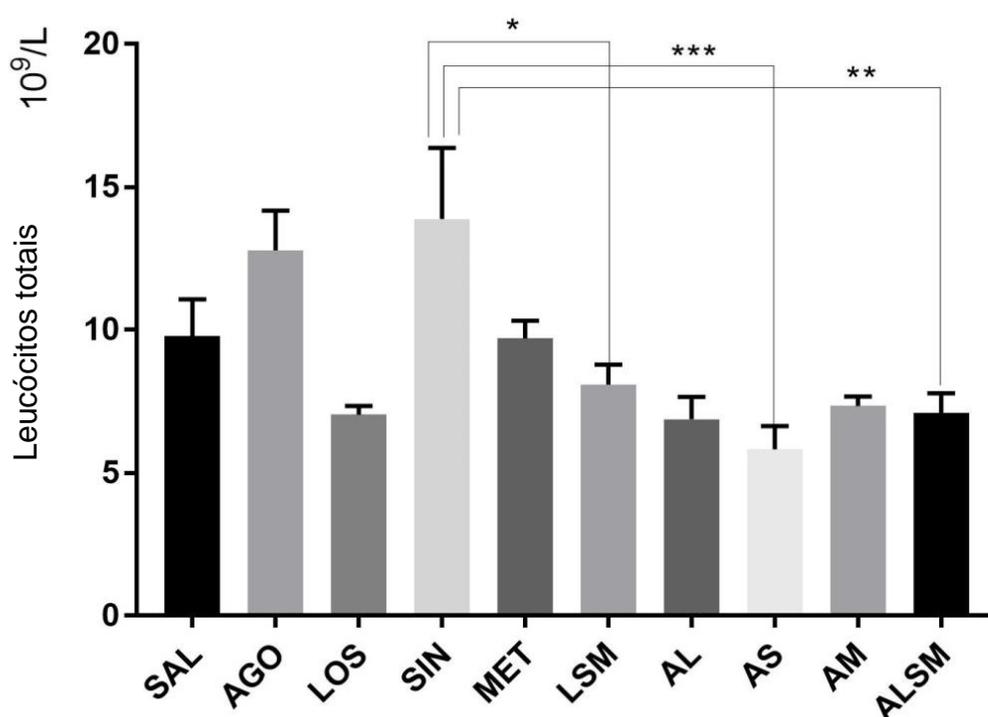


Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. Valores de p - *a: $p=0,0149$; *b: $p=0,0343$; *c: $p=0,0225$; ** $p=0,0020$ - significantes, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: elaborado pelo autor.

Também foi verificada redução significativa ($p < 0,05$) no número de leucócitos totais em todos os grupos em que a sinvastatina foi utilizada em associação com outros fármacos, quando comparado com os animais em uso da sinvastatina isoladamente, porém não em relação ao controle salina (Gráfico 2).

Gráfico 2 – Resultado da análise do número de leucócitos totais nos animais fêmeas. Comparação do grupo sinvastatina usada em monoterapia (SIN) com os grupos de associações da sinvastatina com outros fármacos ($n=6$ animais/grupo).



Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. Valores de p - * $p=0,0186$; ** $p=0,0029$; *** $p=0,0002$ - significantes, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média. Fonte: elaborado pelo autor.

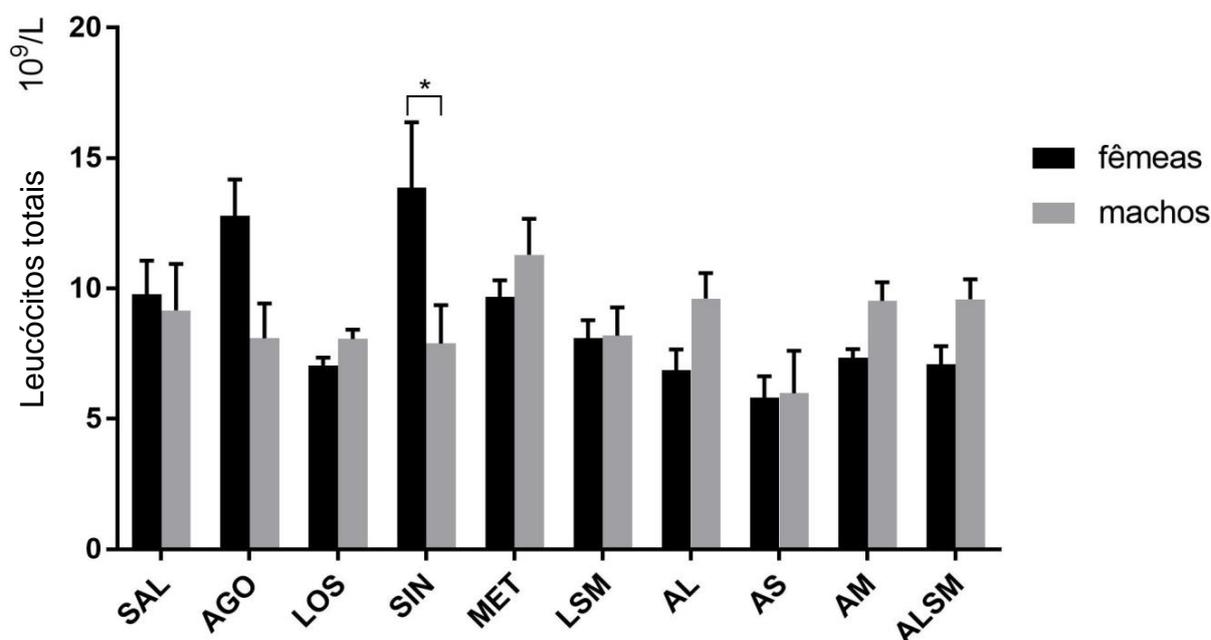
5.1.1.2 Machos

Nos animais machos, não foi observada diferença estatística entre o número de leucócitos totais entre os grupos experimentais.

5.1.1.3 Comparação entre sexos

A comparação do número de leucócitos totais entre sexos revelou diferença significativa ($p < 0,05$) entre fêmeas e machos em uso de sinvastatina, com diminuição dos leucócitos entre os animais machos (Gráfico 3).

Gráfico 3 – Resultado da análise do número de leucócitos totais em fêmeas e machos. Comparação entre sexos (n=6 animais/grupo).



Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. Valor de p - * $p=0,0265$ - significativo, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

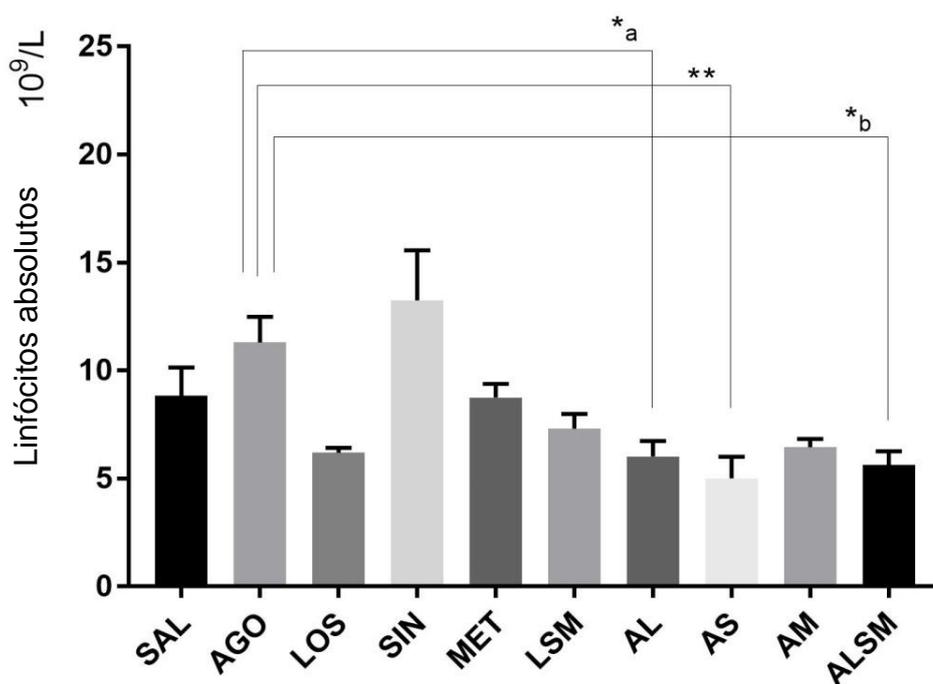
Fonte: elaborado pelo autor.

5.1.2 Linfócitos absolutos

5.1.2.1 Fêmeas

Os animais em uso de agomelatina associada com losartana, com metformina, bem como associada com os três fármacos do estudo, apresentaram diminuição significativa ($p < 0,05$) no número absoluto de linfócitos em relação ao grupo em uso de agomelatina isoladamente (Gráfico 4).

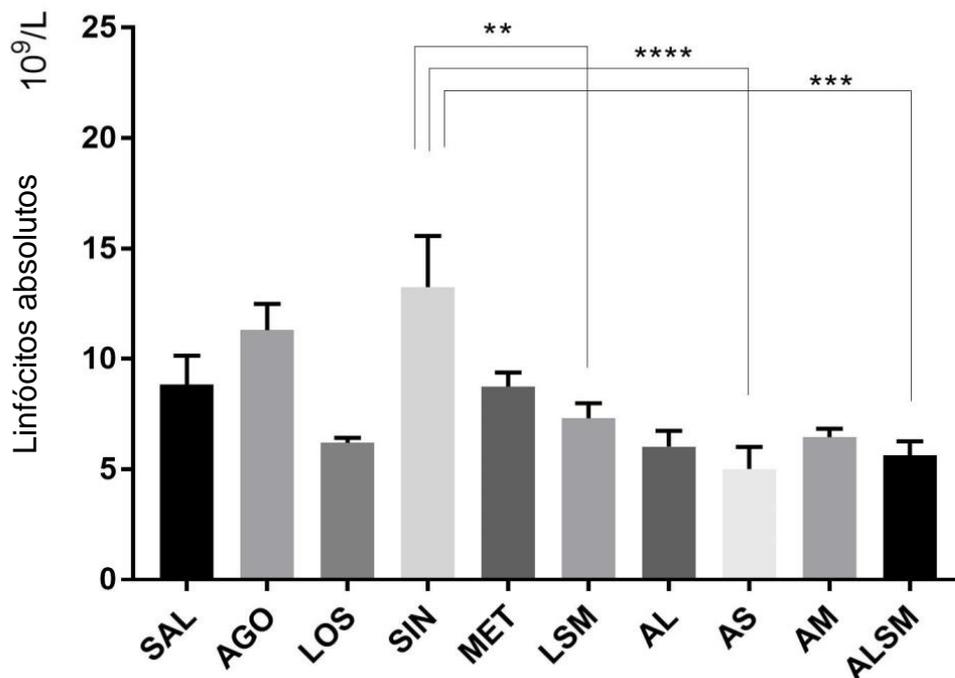
Gráfico 4 – Resultado da análise do número absoluto de linfócitos nos animais fêmeas. Comparação do grupo agomelatina usada em monoterapia (AGO) com os grupos de associações da agomelatina com outros fármacos ($n=6$ animais/grupo).



Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. Valores de p - *a: $p=0,0280$; *b: $p=0,0135$; ** $p=0,0039$ – significantes, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média. Fonte: elaborado pelo autor.

O uso da sinvastatina combinada com agomelatina, bem como com os outros três fármacos do estudo, culminou na redução do número absoluto de linfócitos em relação ao grupo em uso da sinvastatina em monoterapia, conforme se observa no Gráfico 5.

Gráfico 5 – Resultado da análise do número absoluto de linfócitos nos animais fêmeas. Comparação do grupo sinvastatina usada em monoterapia (SIN) com os grupos de associações da sinvastatina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).



Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. Valores de p - *p=0,0080; **p=0,0002, ****p<0,0001 – significantes, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média. Fonte: elaborado pelo autor.

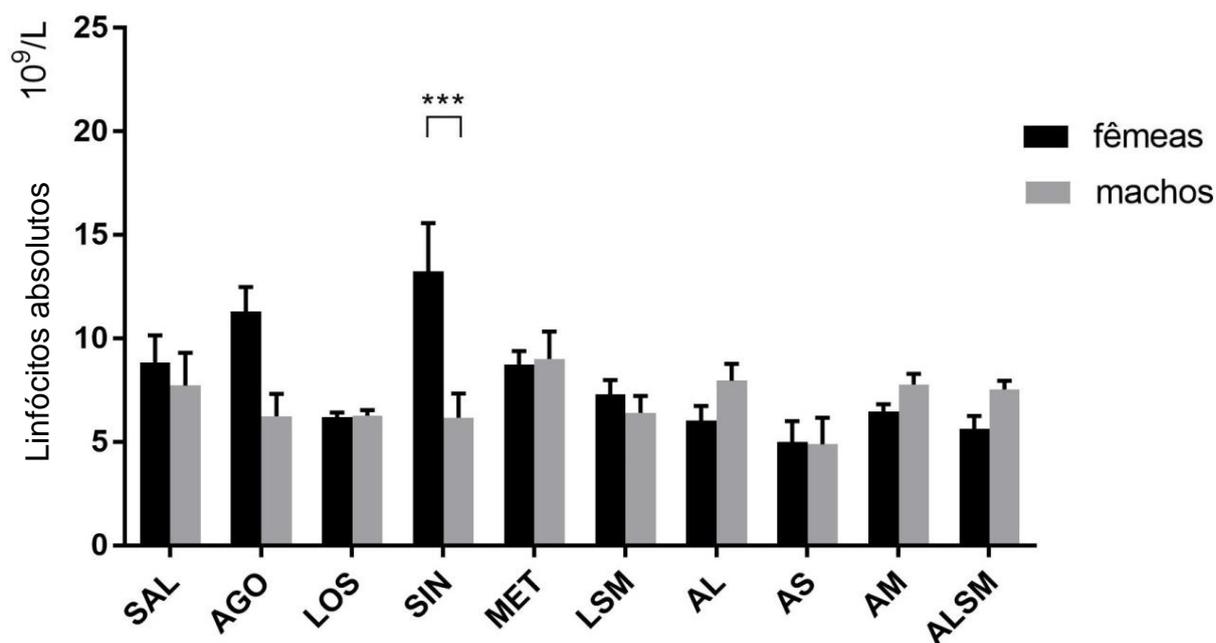
5.1.2.2 Machos

O número absoluto de linfócitos nos animais machos não apresentou alterações relevantes entre os grupos.

5.1.2.3 Comparação entre sexos

Animais machos tratados com sinvastatina em monoterapia apresentaram diminuição no número absoluto de linfócitos em relação às fêmeas em uso do mesmo fármaco, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), conforme demonstrado no Gráfico 6.

Gráfico 6 – Resultado da análise do número absoluto de linfócitos em fêmeas e machos. Comparação entre sexos (n=6 animais/grupo).



Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. ***Valor de $p=0,002$ – significativo, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: elaborado pelo autor.

5.1.3 Linfócitos percentual (%)

Em termos percentuais, não foi observada diferença significativa entre os grupos em relação aos linfócitos nos animais fêmeas, nem nos animais machos ou mesmo na comparação entre sexos.

5.1.4 Monócitos/eosinófilos/basófilos (absolutos)

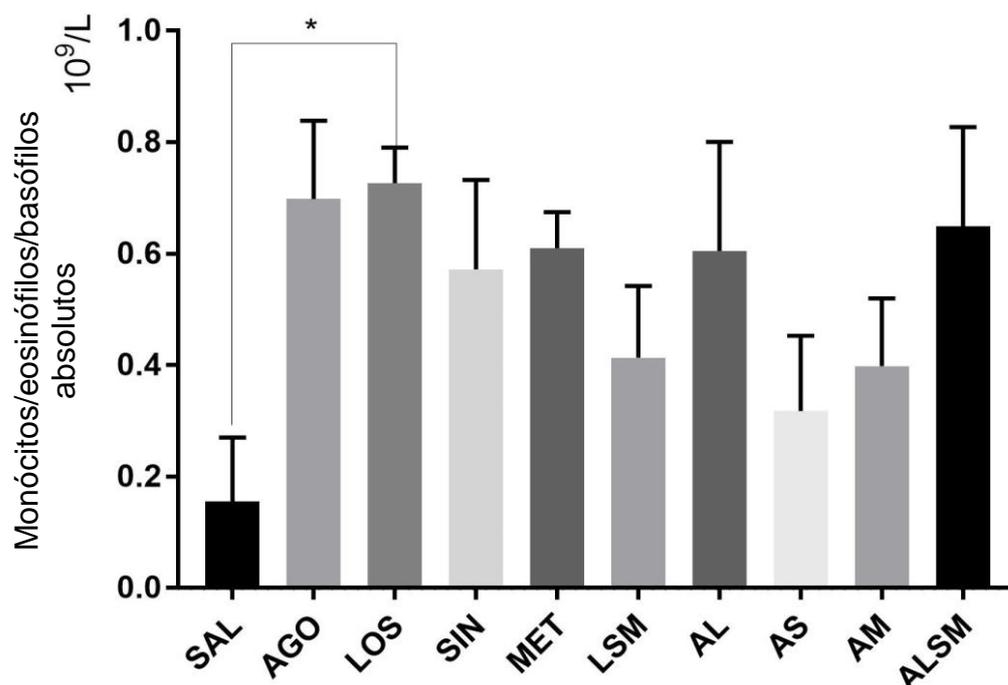
5.1.4.1 Fêmeas

A contagem absoluta de monócitos/eosinófilos/basófilos nas fêmeas não revelou diferença significativa entre os grupos experimentais.

5.1.4.2 Machos

Observou-se elevação significativa no número absoluto de monócitos/eosinófilos/basófilos nos animais em uso de losartana em monoterapia em relação ao grupo controle salina (Gráfico 7).

Gráfico 7 – Resultado da análise do número absoluto de monócitos/eosinófilos/basófilos nos animais machos. Comparação dos grupos entre si (n=6 animais/grupo).



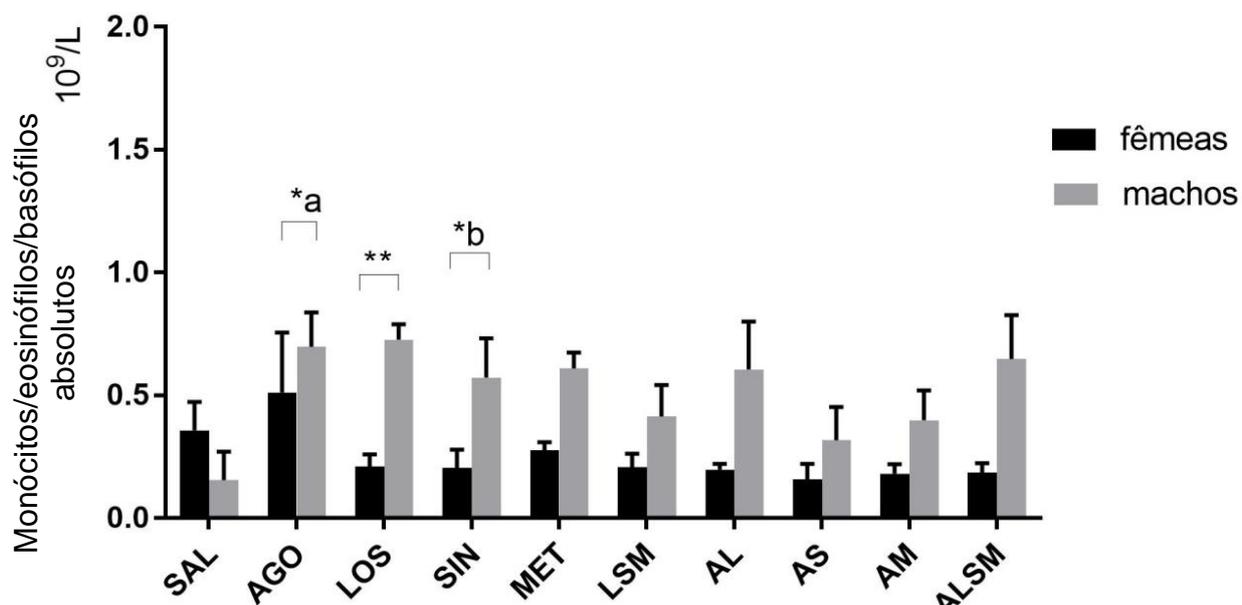
Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. *Valor de $p=0.0462$, significantes, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: elaborado pelo autor.

5.1.4.3 Comparação entre sexos

A comparação entre sexos mostrou que, nos grupos em uso de agomelatina, losartana e metformina usados isoladamente, ocorreu aumento significativo ($p<0,05$) no número absoluto de monócitos/eosinófilos/basófilos nos animais machos, de acordo com o que pode ser observado no Gráfico 8.

Gráfico 8 – Resultado da análise do número absoluto de monócitos/eosinófilos/basófilos em fêmeas e machos. Comparação entre sexos (n=6 animais/grupo).



Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. Valores de p - *a: p=0,0215; *b: p=0,0157; **p=0,0049 – significantes, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média. Fonte: elaborado pelo autor.

5.1.5 Monócitos/eosinófilo/basófilos percentual (%)

O percentual de monócitos/eosinófilos/basófilos nas fêmeas, machos e na comparação entre sexos, não revelou alterações relevantes entre os grupos.

5.1.6 Granulócitos absolutos e percentual

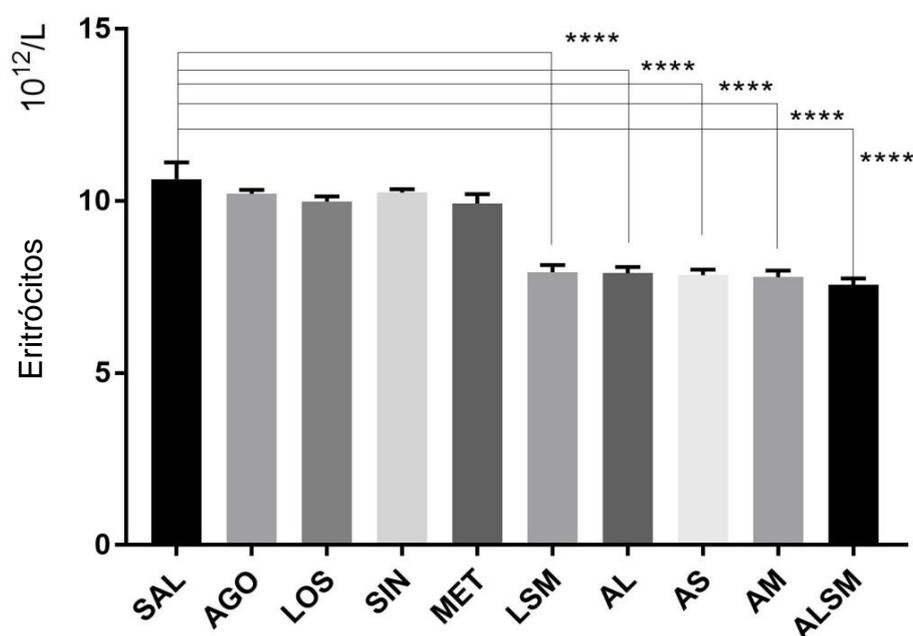
Os granulócitos, tanto em número absoluto quanto em percentual, não apresentaram diferenças estatísticas significantes entre os grupos experimentais e nem entre sexos.

5.1.7 Eritrócitos

5.1.7.1 Fêmeas

As fêmeas apresentaram redução no número de eritrócitos altamente significativa ($p < 0,0001$) em todos os grupos de associações de fármacos (LSM, AL, AS, AM, ALSM) em relação ao grupo controle salina, conforme mostra o Gráfico 9.

Gráfico 9 – Resultado da análise do número absoluto de eritrócitos nos animais fêmeas. Comparação dos grupos com o grupo controle salina (SAL) ($n=6$ animais/grupo).

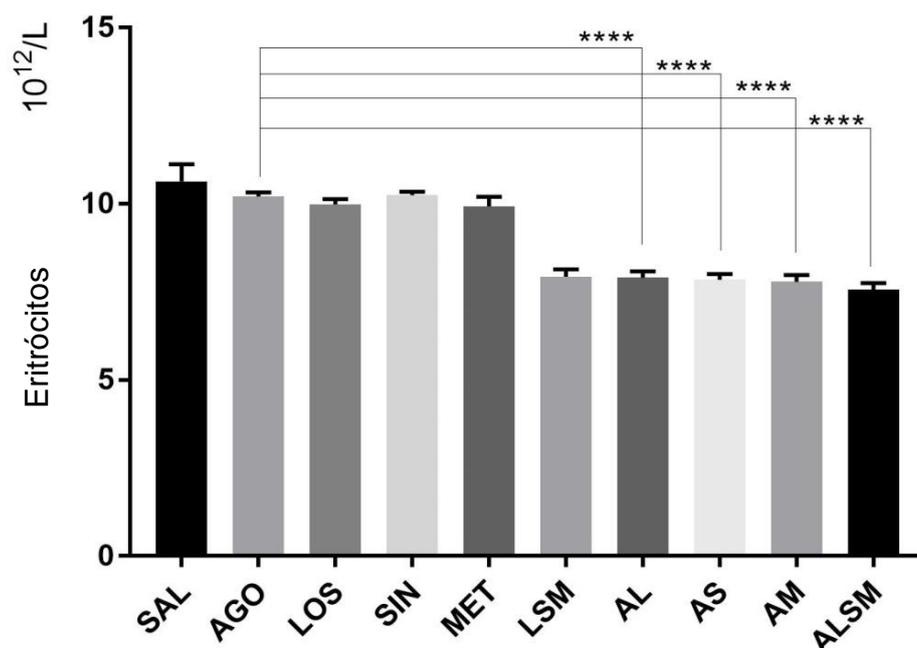


Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. ****Valores de $p < 0,0001$ – significantes, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: elaborado pelo autor.

Também foi observada diminuição importante ($p < 0,0001$) no número de eritrócitos em todos os grupos em que a agomelatina foi utilizada em associação com um ou três fármacos do estudo em relação ao grupo que utilizou a agomelatina em monoterapia (Gráfico 10).

Gráfico 10 – Resultado da análise do número absoluto de eritrócitos nos animais fêmeas. Comparação do grupo agomelatina usada em monoterapia (AGO) com os grupos de associações da agomelatina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).

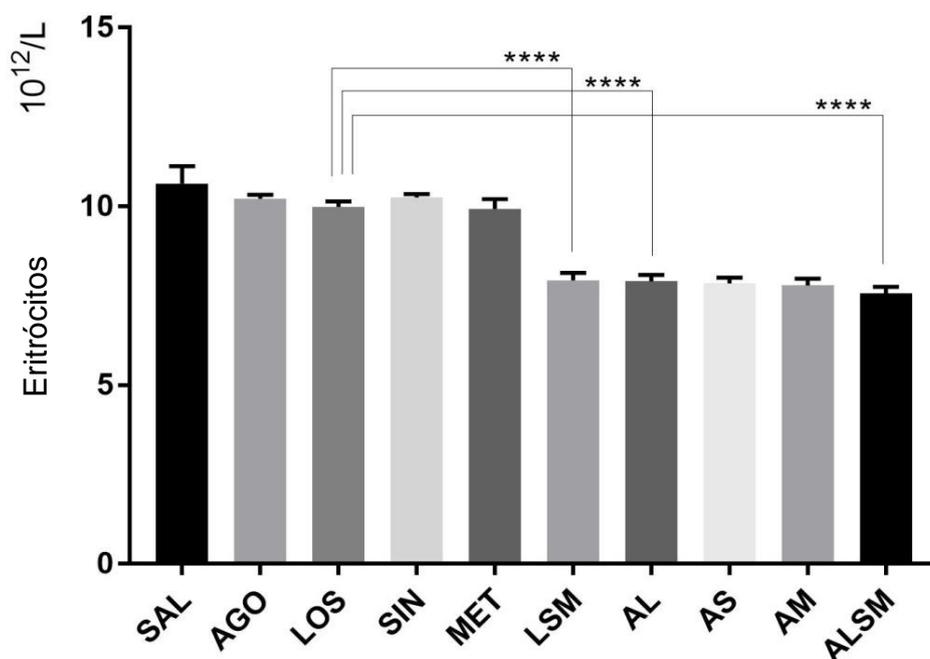


Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. ****Valores de $p < 0,0001$ – significantes, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: elaborado pelo autor.

A losartana usada em associação com os outros fármacos do estudo causou redução relevante ($p < 0,0001$) no número de eritrócitos dos animais fêmeas quando comparada com seu uso em monoterapia, conforme pode ser observado no Gráfico 11.

Gráfico 11 – Resultado da análise do número absoluto de eritrócitos nos animais fêmeas. Comparação do grupo losartana usada em monoterapia (LOS) com os grupos de associações da losartana com outros fármacos (n=6 animais/grupo).

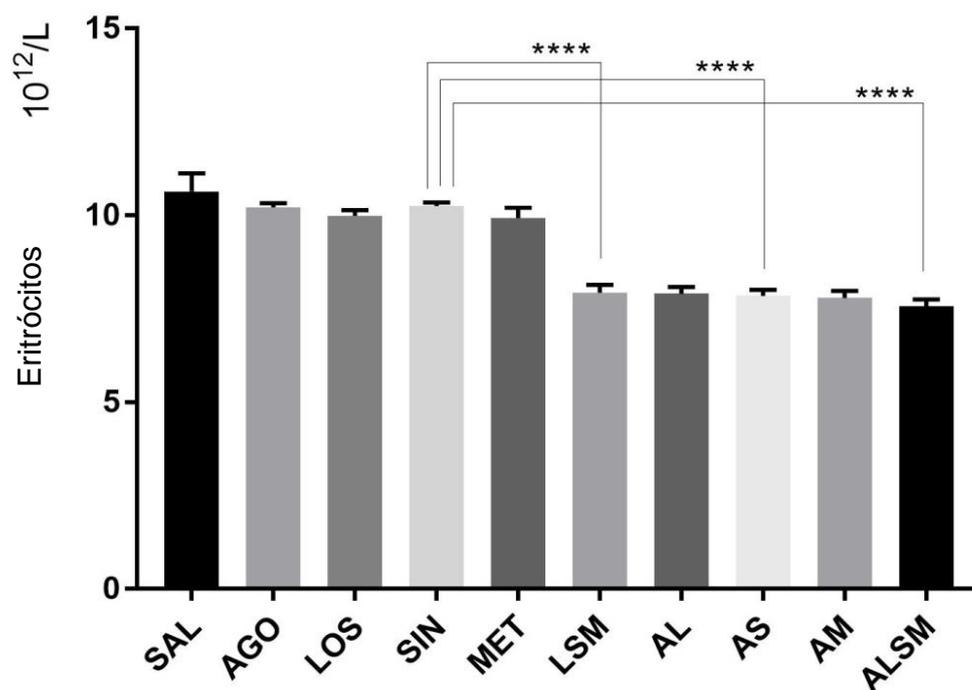


Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. ****Valores de $p < 0,0001$ – significantes, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: elaborado pelo autor.

Também a sinvastatina quando utilizada em associações causou significativa redução ($p < 0,0001$) no número de eritrócitos dos animais fêmeas, quando comparada ao grupo que utilizou a sinvastatina isoladamente (Gráfico 12).

Gráfico 12 – Resultado da análise do número absoluto de eritrócitos nos animais fêmeas. Comparação do grupo sinvastatina usada em monoterapia (SIN) com os grupos de associações da sinvastatina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).

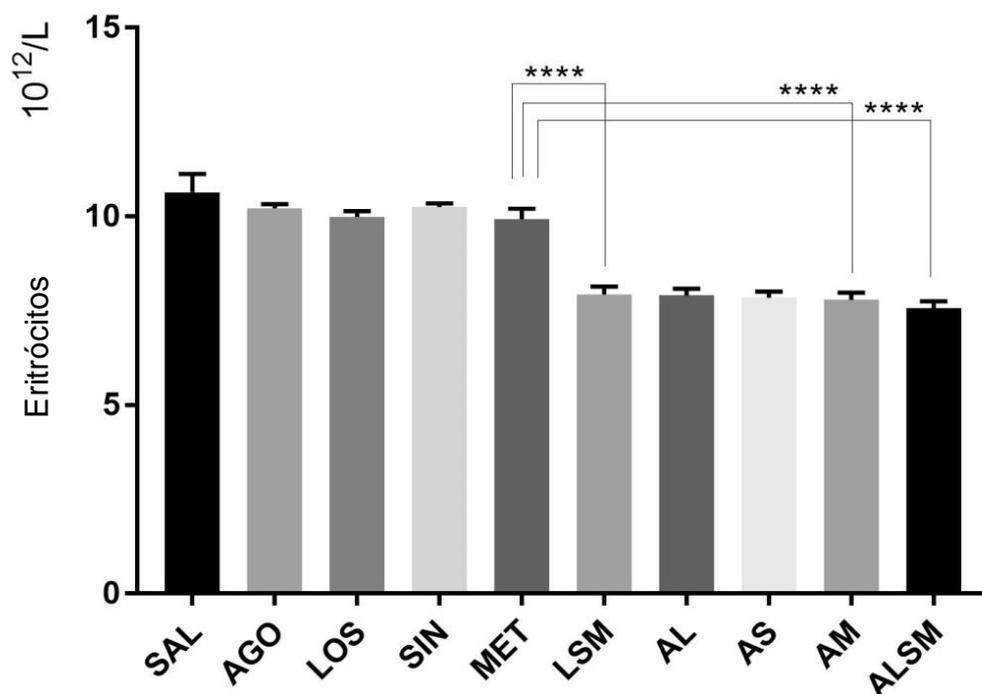


Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. ****Valores de $p < 0,0001$ – significantes, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: elaborado pelo autor.

O uso de metformina combinada com os demais fármacos do estudo também culminou na redução relevante ($p < 0,0001$) no número de eritrócitos nas fêmeas, em relação ao grupo que fez uso da metformina de modo isolado (Gráfico 13).

Gráfico 13 – Resultado da análise do número absoluto de eritrócitos nos animais fêmeas. Comparação do grupo metformina usada em monoterapia (MET) com os grupos de associações da metformina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).



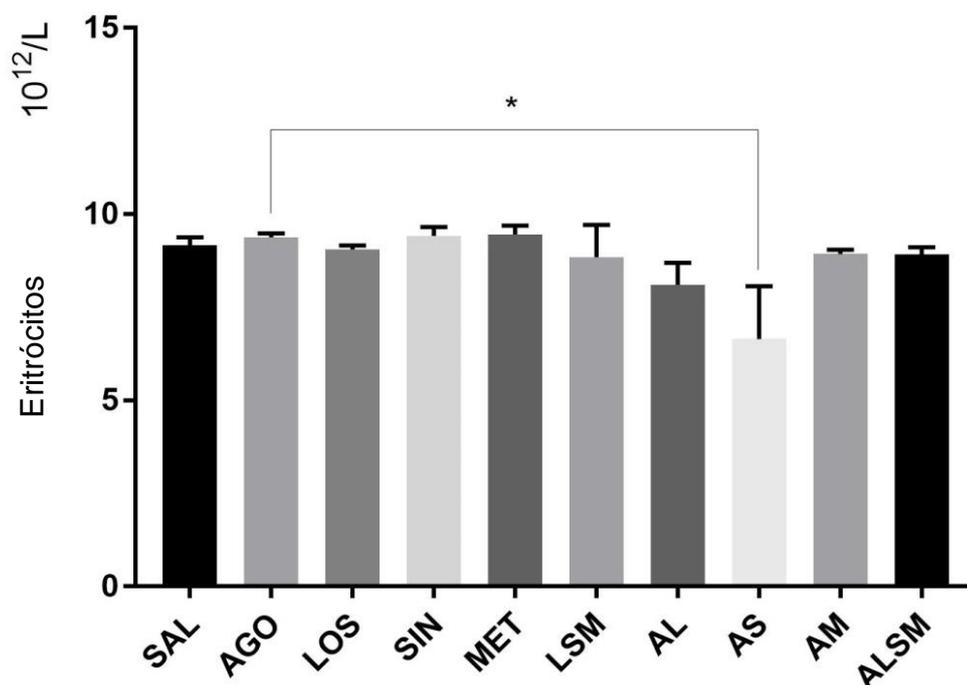
Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. ****Valores de $p < 0,0001$ – significantes, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: elaborado pelo autor.

5.1.7.2 Machos

Dentre os machos, observou-se discreta redução no número de eritrócitos ($p < 0,05$) nos grupos que usaram a associação agomelatina+sinvastatina tanto em relação à agomelatina em monoterapia, quanto em relação à sinvastatina usada isoladamente (Gráficos 14 e 15).

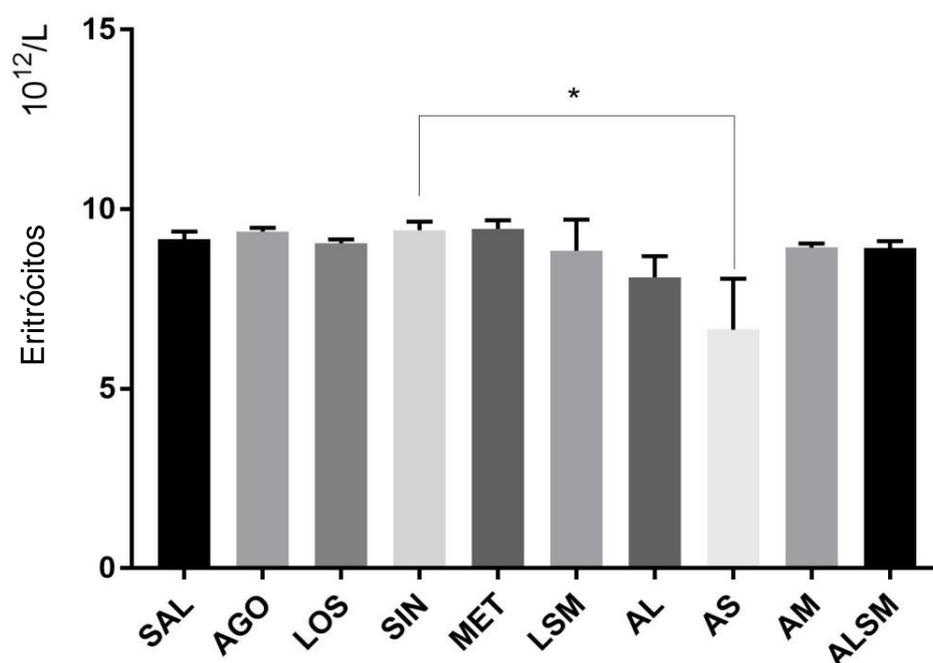
Gráfico 14 – Resultado da análise do número absoluto de eritrócitos nos animais machos. Comparação do grupo agomelatina usada em monoterapia (AGO) com os grupos de associações da agomelatina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).



Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. *Valor de $p=0,00486$ – significativo, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: elaborado pelo autor.

Gráfico 15 – Resultado da análise do número absoluto de eritrócitos nos animais machos. Comparação do grupo sinvastatina usada em monoterapia (SIN) com os grupos de associações da sinvastatina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).



Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. *Valor de $p=0,0432$ – significantes, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: elaborado pelo autor.

5.1.7.3 Comparação entre sexos

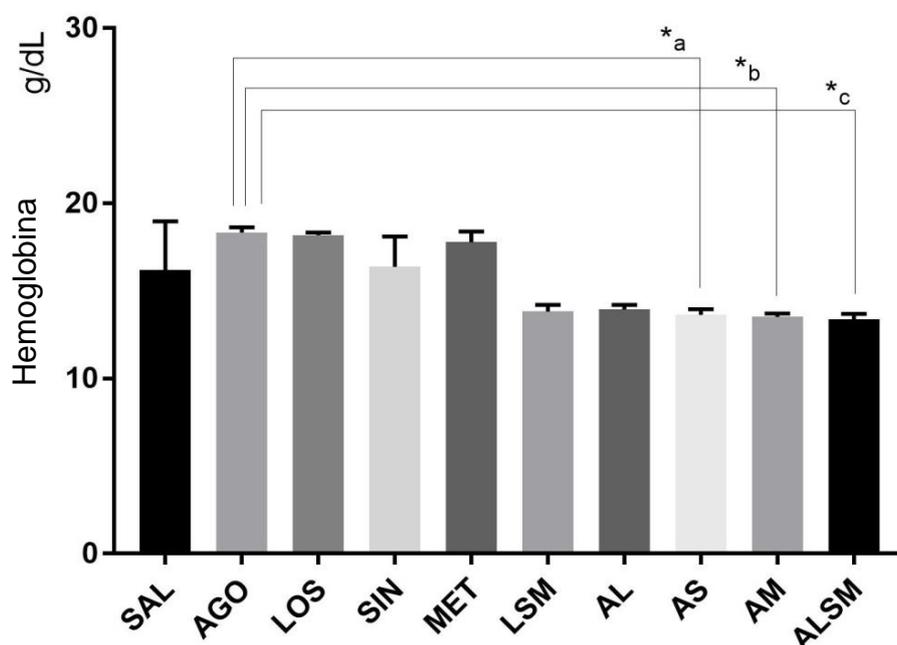
Não foi verificada diferença no número de eritrócitos entre os grupos ao serem comparados os animais por sexo.

5.1.8 Hemoglobina

5.1.8.1 Fêmeas

As fêmeas em uso das associações da agomelatina com losartana, com metformina e com os outros três fármacos do estudo apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) na taxa de hemoglobina em relação àquelas que utilizaram apenas a agomelatina, conforme observado no Gráfico 17.

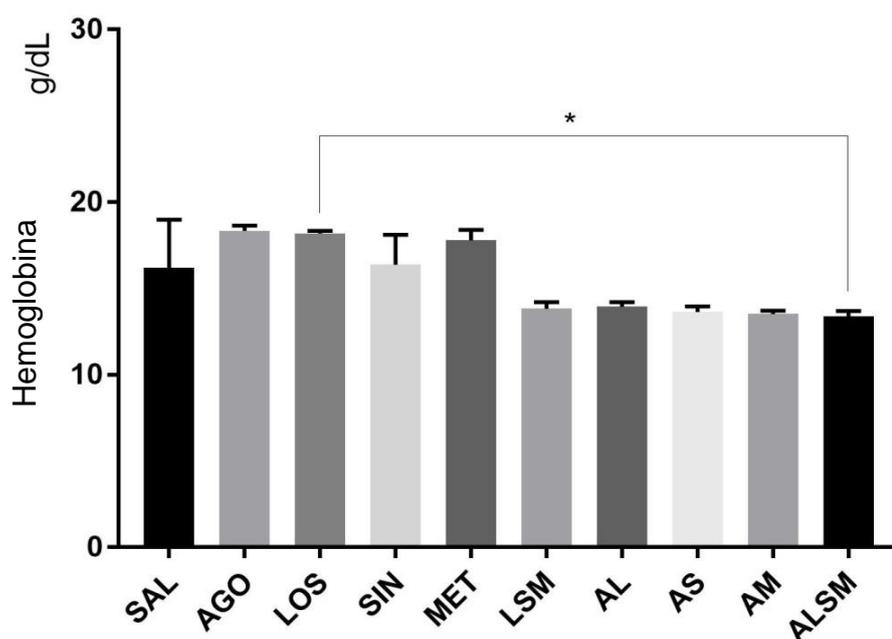
Gráfico 16 – Resultado da análise da hemoglobina nos animais fêmeas. Comparação do grupo agomelatina usada em monoterapia (AGO) com os grupos de associações da agomelatina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).



Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. Valores de p - *a: $p=0,0371$; *b: $p=0,0296$; *c: $p=0,0219$ – significantes, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média. Fonte: elaborado pelo autor.

O Gráfico 17 mostra que houve redução ($p < 0,05$) na taxa de hemoglobina das fêmeas em polifarmácia (em uso dos quatro fármacos de estudo), quando comparada ao grupo de animais que utilizou apenas losartana.

Gráfico 17 – Resultado da análise da hemoglobina nos animais fêmeas. Comparação do grupo losartana usada em monoterapia (LOS) com os grupos de associações da losartana com outros fármacos ($n=6$ animais/grupo).



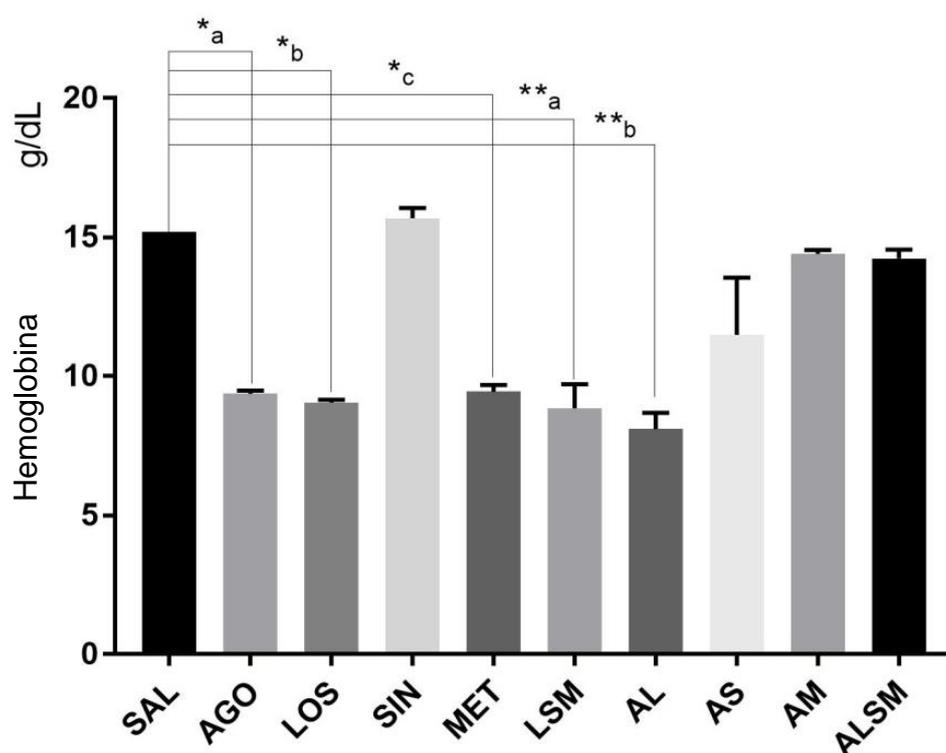
Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. *Valor de $p=0,0296$ – significativo, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: elaborado pelo autor.

5.1.8.2 Machos

Vários grupos de tratamento dos animais machos apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) na taxa de hemoglobina em relação ao grupo controle salina, a saber: grupos da agomelatina, losartana e metformina usados em monoterapia, bem como os grupos de associação entre três fármacos e no grupo em uso de agomelatina+losartana, conforme demonstrado no Gráfico 18.

Gráfico 18 – Resultado da análise da hemoglobina nos animais machos. Comparação dos grupos entre si ($n=6$ animais/grupo).

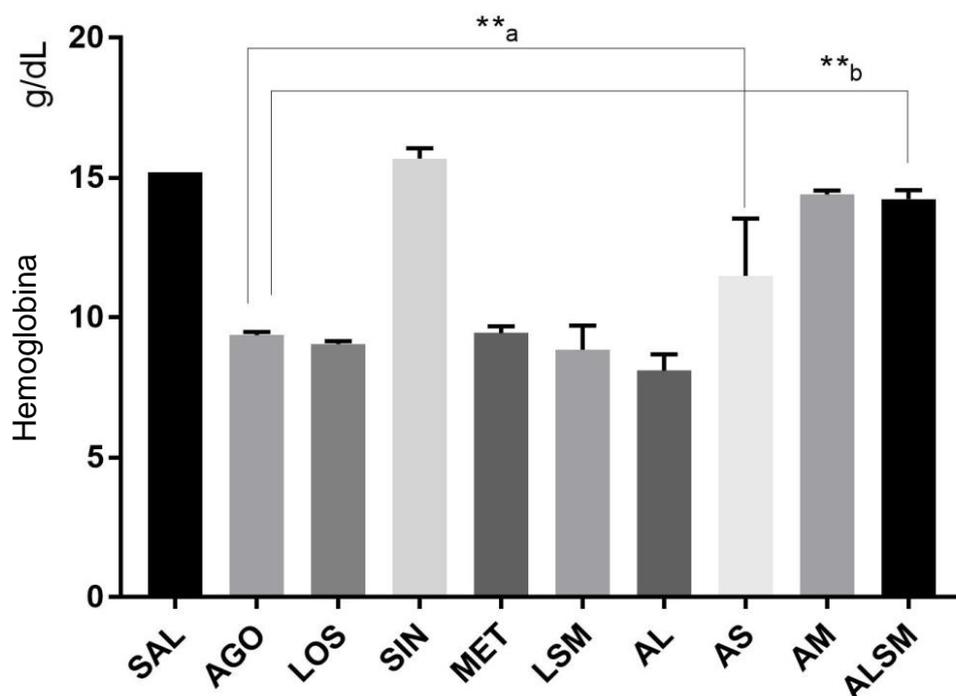


Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. Valores de p - *a: $p=0,0222$; *b: $p=0,0126$; *c: $p=0,0432$; **a: $p=0,0082$; **b: $p=0,0022$ – significantes, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: elaborado pelo autor.

Animais machos em uso de agomelatina com sinvastatina, bem como em uso de todos os fármacos em associação tiveram redução significativa ($p < 0,05$) na taxa de hemoglobina quando comparados com o grupo de animais em uso de agomelatina em monoterapia (Gráfico 19).

Gráfico 19 – Resultado da análise da hemoglobina nos animais machos. Comparação do grupo agomelatina usada em monoterapia (AGO) com os grupos de associações da agomelatina com outros fármacos ($n=6$ animais/grupo).

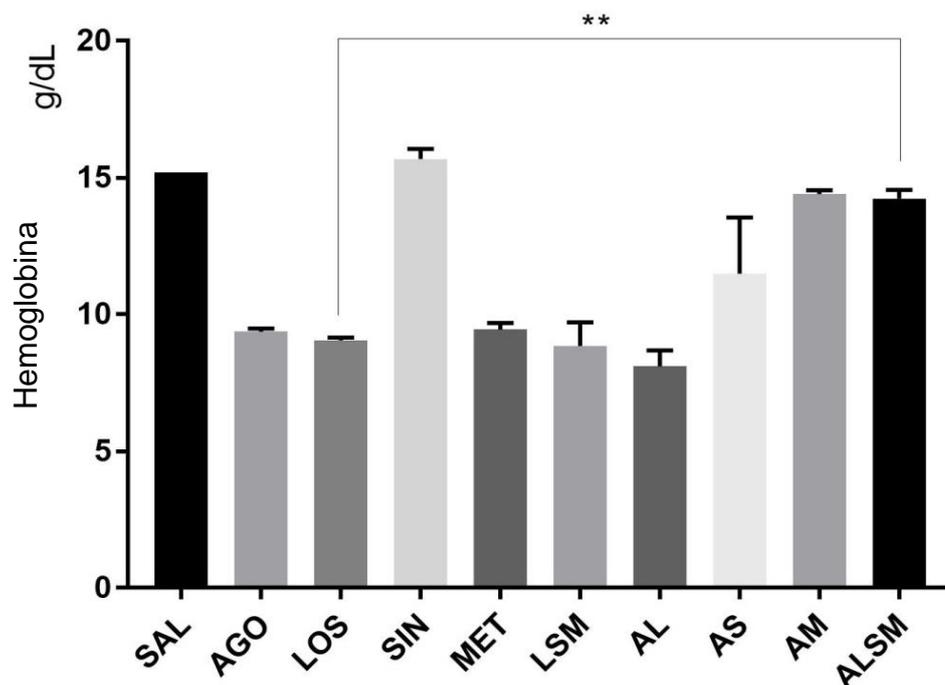


Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. Valores de p - **a: $p=0,0022$; *b: $p=0,0034$ – significantes, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: elaborado pelo autor.

Houve redução na taxa de hemoglobina também no grupo de machos em uso dos quatro fármacos quando comparados com aqueles animais que fizeram uso da losartana isoladamente, como demonstrado no Gráfico 20.

Gráfico 20 – Resultado da análise da hemoglobina nos animais machos. Comparação do grupo losartana usada em monoterapia (LOS) com os grupos de associações da losartana com outros fármacos (n=6 animais/grupo).

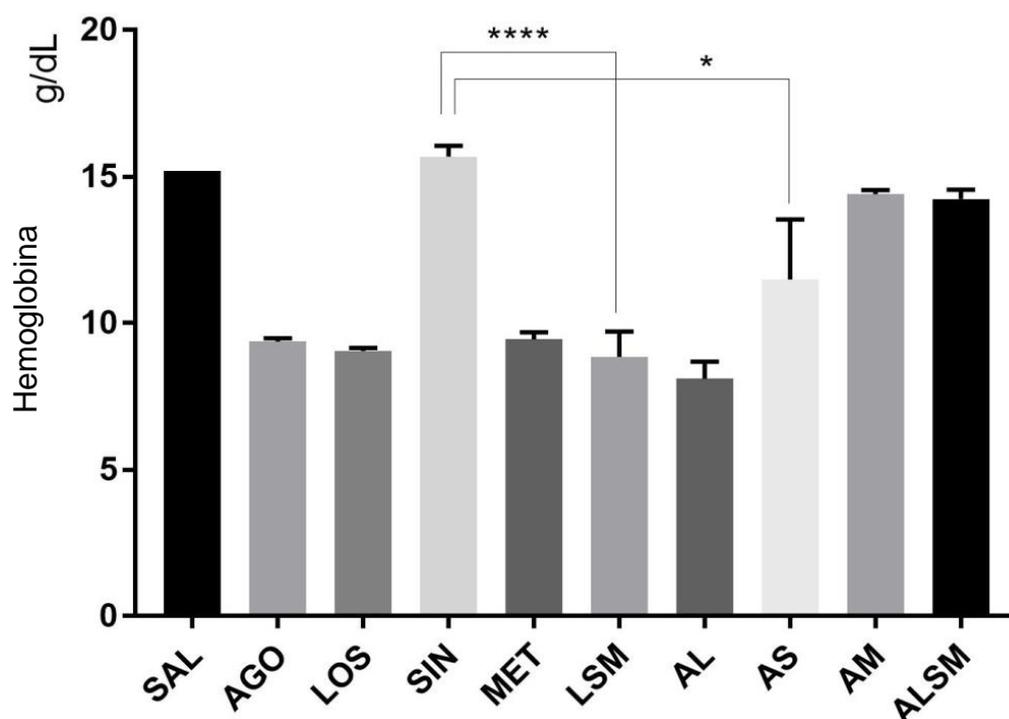


Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. **Valor de $p=0,0014$ – significativo, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: elaborado pelo autor.

A taxa de hemoglobina foi significativamente reduzida ($p < 0,0001$) no grupo em uso de sinvastatina associada a losartana e metformina e, também, no grupo em que a sinvastatina foi associada somente à agomelatina ($p < 0,05$), quando comparada com o grupo de animais em monoterapia com sinvastatina (Gráfico 21).

Gráfico 21 – Resultado da análise da hemoglobina nos animais machos. Comparação do grupo sinvastatina usada em monoterapia (SIN) com os grupos de associações da sinvastatina com outros fármacos ($n=6$ animais/grupo).

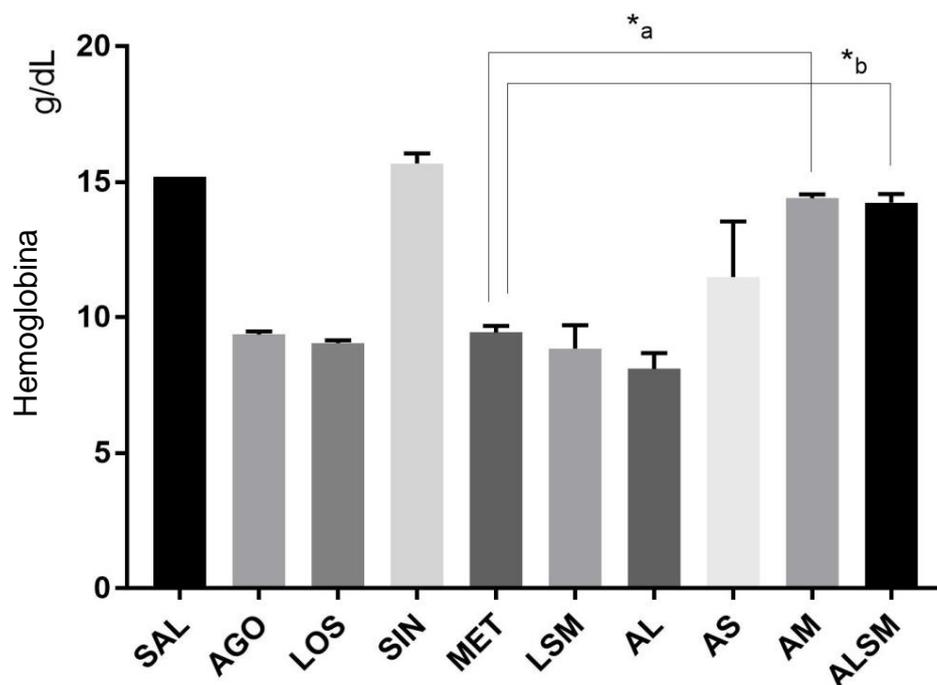


Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. Valores de p - * $p=0,0182$; **** $p < 0,0001$ – significantes, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: elaborado pelo autor.

Os machos em uso dos quatro fármacos, bem como aqueles que utilizaram metformina associada à agomelatina, apresentaram diminuição da taxa de hemoglobina comparativamente ao grupo em uso de metformina isoladamente, como mostra o Gráfico 22.

Gráfico 22 – Resultado da análise da hemoglobina nos animais machos. Comparação do grupo metformina usada em monoterapia (MET) com os grupos de associações da metformina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).

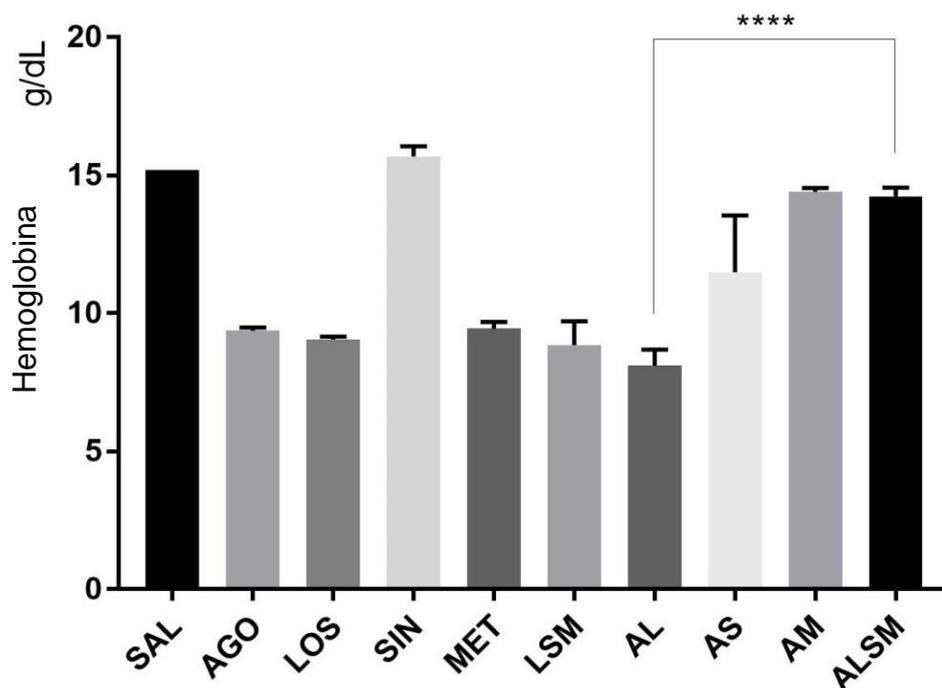


Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. Valores de p - *a: $p=0,0105$; *b: $p=0,0152$ – significantes, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: elaborado pelo autor.

Dentre as associações de fármacos, observou-se relevante redução na taxa de hemoglobina no grupo em uso dos quatro fármacos em relação ao grupo em uso da associação agomelatina+losartana (Gráfico 23).

Gráfico 34 – Resultado da análise da hemoglobina nos animais machos. Comparação do grupo da associação de agomelatina com losartana com o grupo da associação de agomelatina, losartana, sinvastatina e metformina (n=6 animais/grupo).



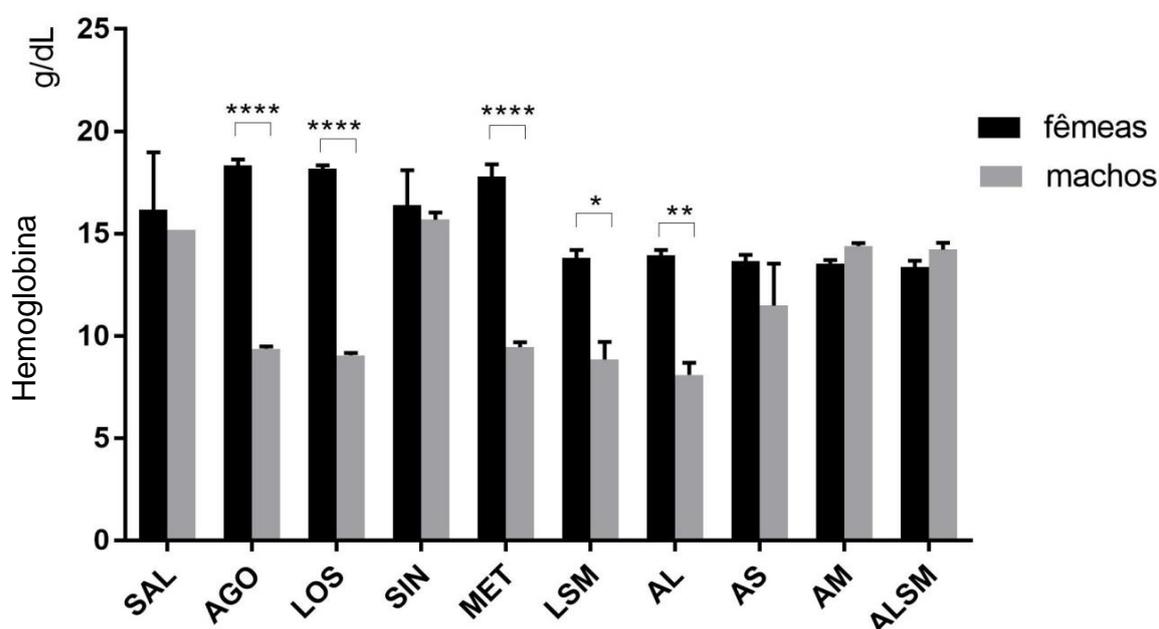
Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. ****Valor de $p < 0,0001$ – significativo, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: elaborado pelo autor.

5.1.8.3 Comparação entre sexos

Ao se comparar os resultados da taxa de hemoglobina entre os sexos, observa-se a importante redução nesta taxa nos animais machos dos grupos em uso de agomelatina losartana e metformina, quando em monoterapia ($p < 0,0001$), bem como nos grupos de associações de losartana, sinvastatina e metformina e de agomelatina com losartana ($p < 0,05$), conforme o Gráfico 24.

Gráfico 24 – Resultado da análise da hemoglobina em fêmeas e machos. Comparação entre sexos (n=6 animais/grupo).



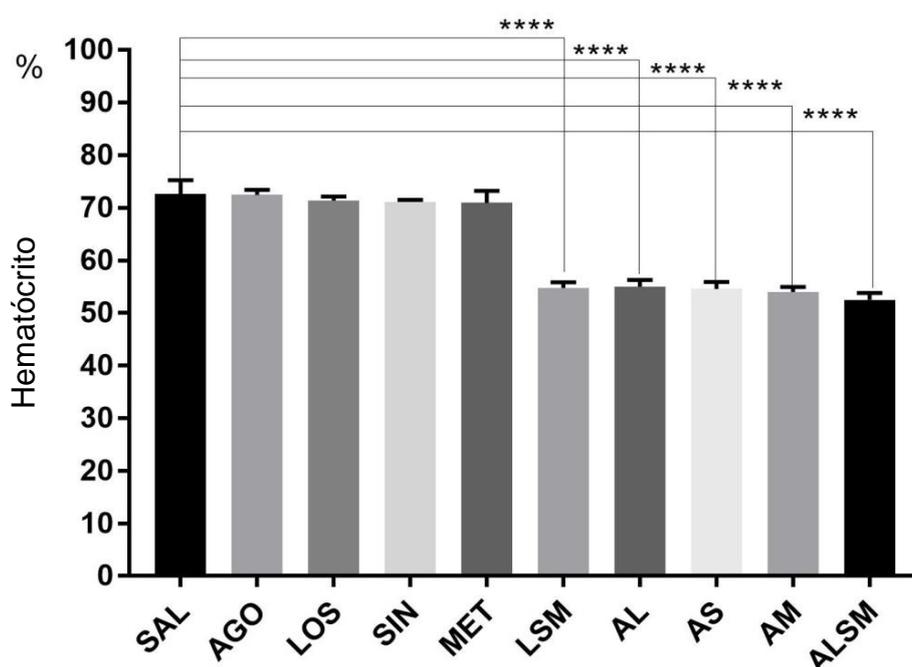
Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. Valores de p - * $p = 0,0194$; ** $p = 0,0018$; **** $p < 0,001$, significantes, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média. Fonte: elaborado pelo autor.

5.1.9 Hematócrito

5.1.9.1 Fêmeas

Todos os grupos em tratamento com associações de fármacos (LSM, AL, AS, AM, ALSM) apresentaram redução bastante significativa ($p < 0,0001$) no hematócrito quando comparados com o grupo controle salina (Gráfico 25).

Gráfico 25 – Resultado da análise do hematócrito nos animais fêmeas. Comparação dos grupos de tratamento com o grupo controle salina (SAL) ($n=6$ animais/grupo).

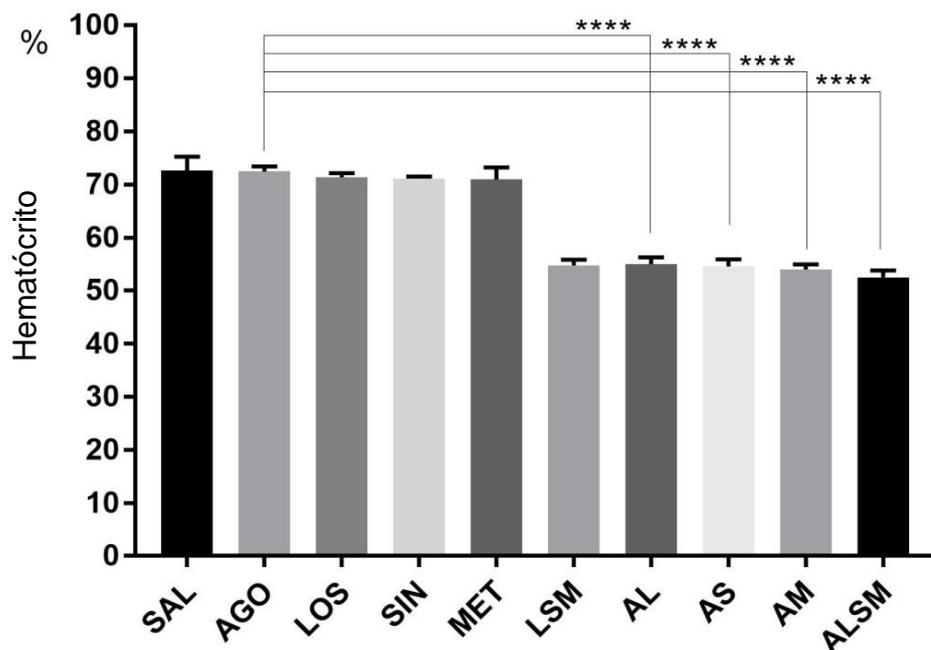


Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. ****Valores de $p < 0,0001$ – significantes, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: elaborado pelo autor.

A diminuição relevante no hematócrito também foi observada quando são comparados os grupos de fármacos em associações a respectivos grupos em uso dos fármacos em monoterapia, conforme se verifica nos Gráficos 26 a 29.

Gráfico 26 – Resultado da análise do hematócrito nos animais fêmeas. Comparação do grupo agomelatina em monoterapia (AGO) com os grupos de associação da agomelatina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).

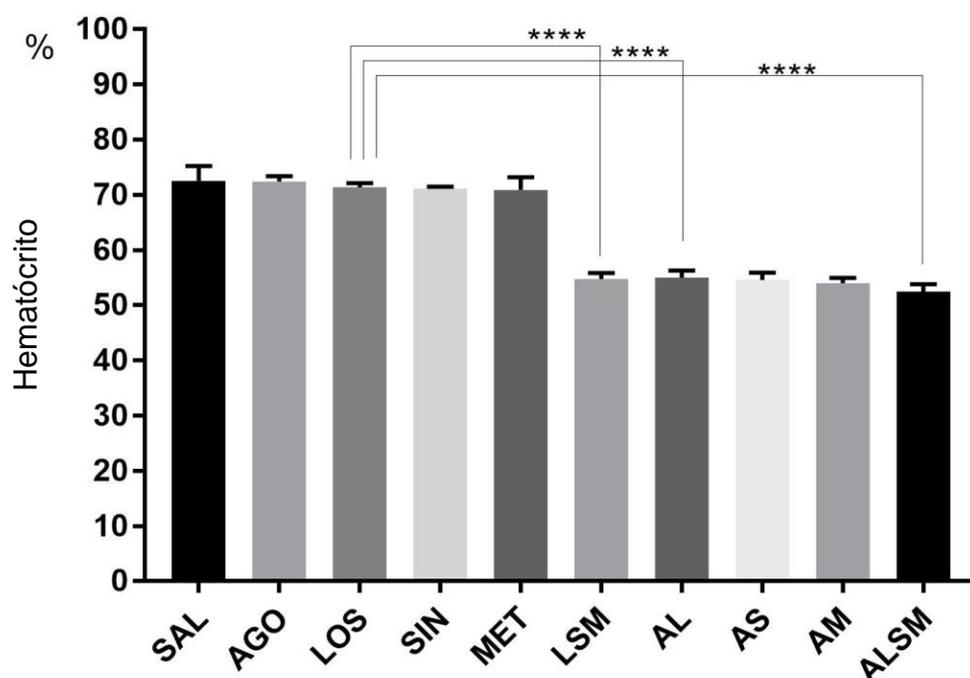


Legenda:

SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. ****Valores de $p < 0,0001$ – significantes, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: elaborado pelo autor.

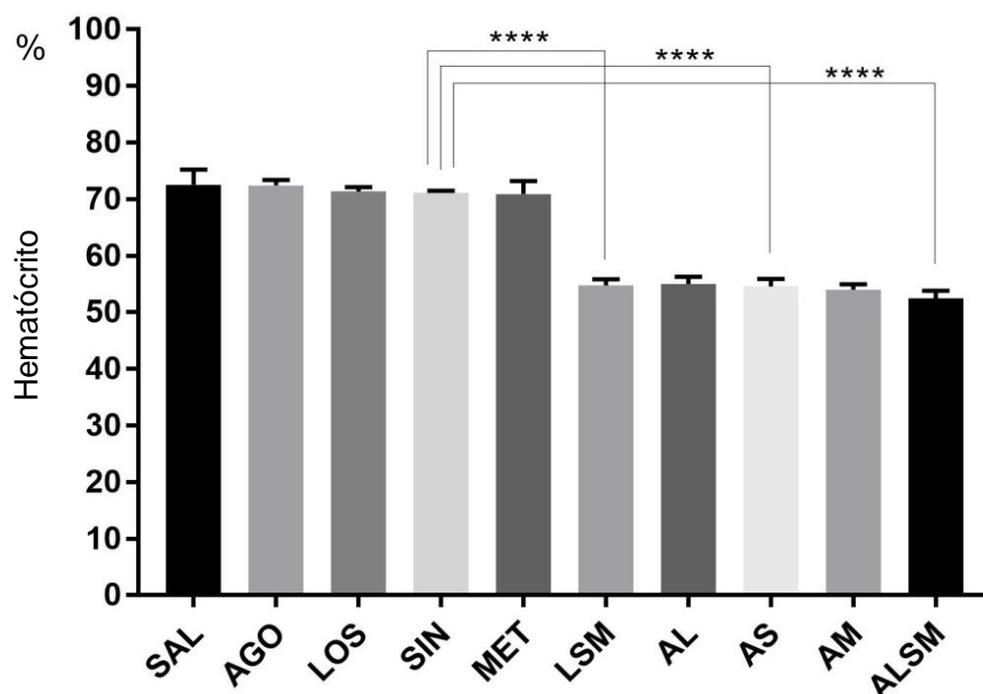
Gráfico 27 – Resultado da análise do hematócrito nos animais fêmeas. Comparação do grupo losartana em monoterapia (LOS) com os grupos de associação da losartana com outros fármacos (n=6 animais/grupo).



Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. ****Valores de $p < 0,0001$ – significantes, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: elaborado pelo autor.

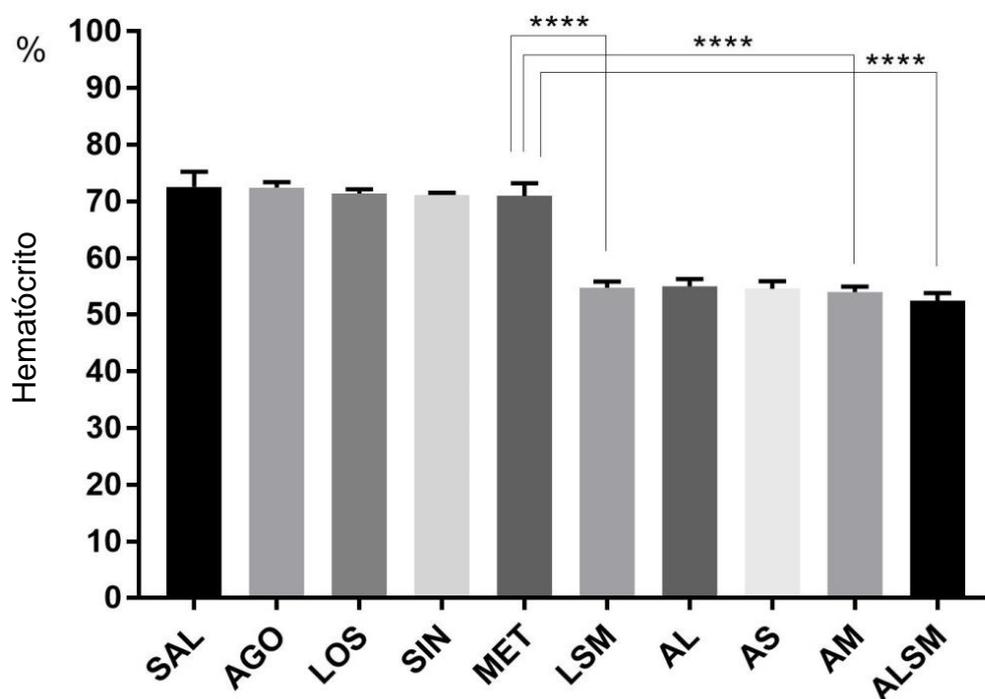
Gráfico 28 – Resultado da análise do hematócrito nos animais fêmeas. Comparação do grupo sinvastatina em monoterapia (SIN) com os grupos de associação da sinvastatina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).



Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. ****Valores de $p < 0,0001$ – significantes, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: elaborado pelo autor.

Gráfico 29 – Resultado da análise do hematócrito nos animais fêmeas. Comparação do grupo metformina em monoterapia (MET) com os grupos de associação da metformina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).



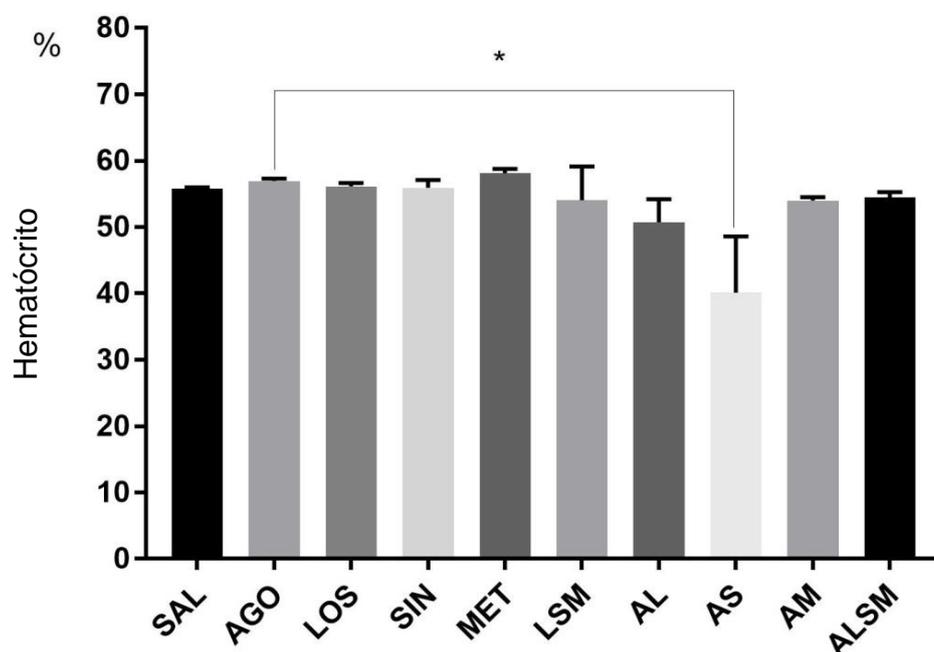
Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. ****Valores de $p < 0,0001$ – significantes, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: elaborado pelo autor.

5.1.9.2 Machos

Dentre os machos, a redução do hematócrito somente foi observada no grupo de animais em uso de agomelatina associada a sinvastatina, sendo esta redução significativa em relação ao uso da agomelatina isoladamente (Gráfico 30).

Gráfico 30 – Resultado da análise do hematócrito nos animais machos. Comparação do grupo agomelatina em monoterapia (AGO) com os grupos de associação da agomelatina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).



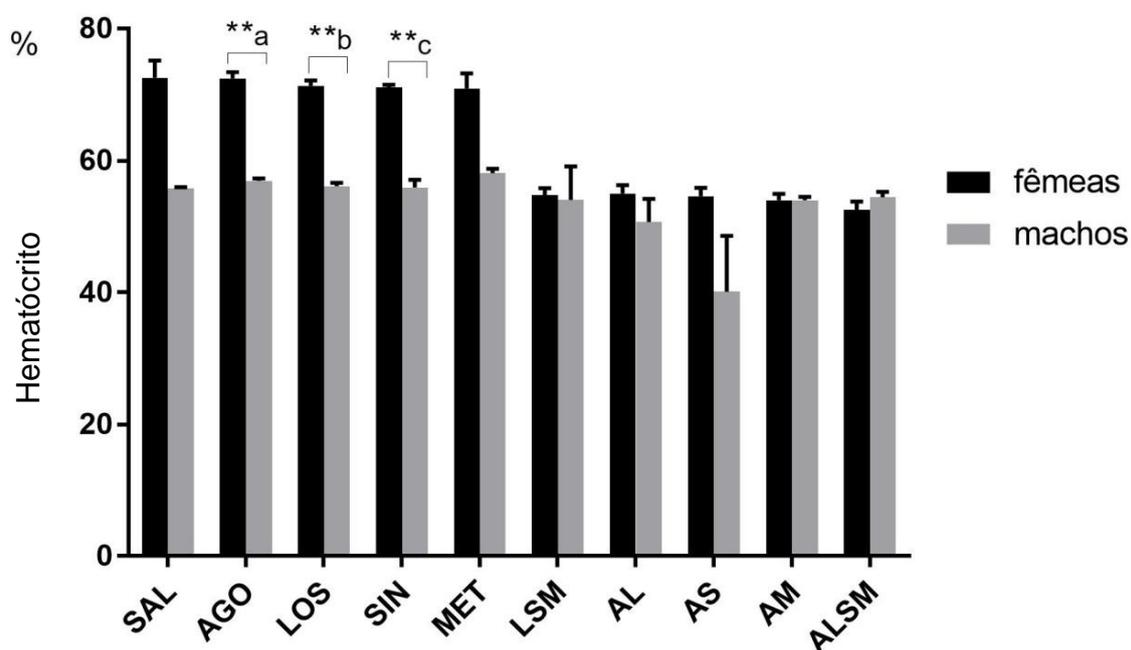
Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. *Valor de $p=0,0310$ – significativo, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: elaborado pelo autor.

5.1.9.3 Comparação entre sexos

O hematócrito foi consideravelmente inferior dentre os machos em relação às fêmeas nos grupos de tratamento com agomelatina, losartana e sinvastatina usados em monoterapia (Gráfico 31).

Gráfico 31 – Resultado da análise do hematócrito em fêmeas e machos. Comparação entre sexos (n=6 animais/grupo).



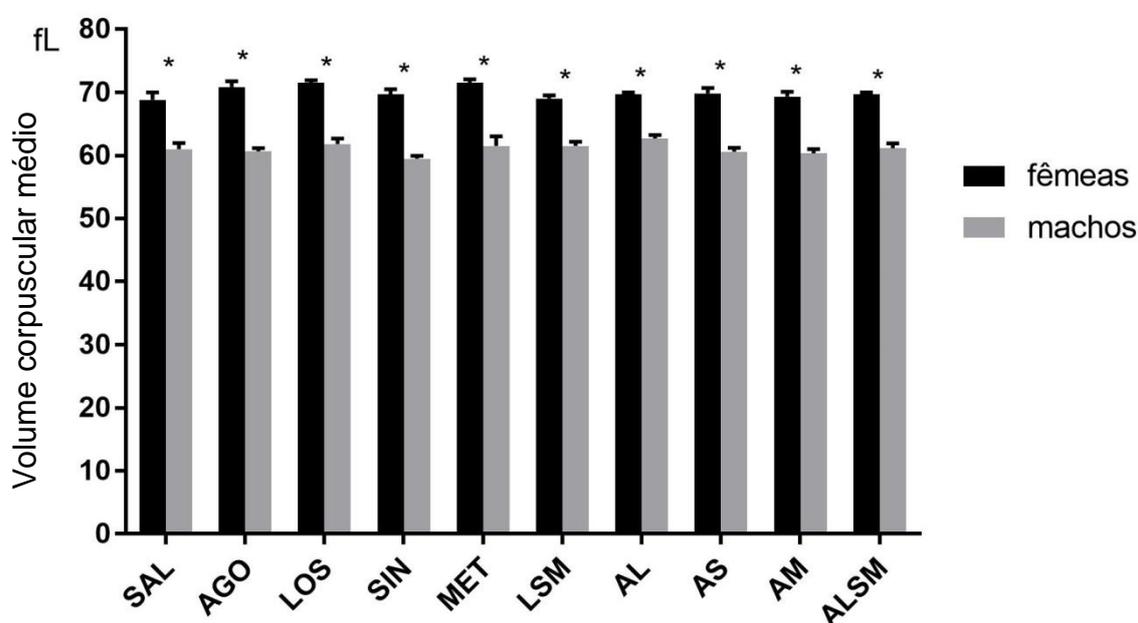
Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. Valores de p - ^{**a}: p=0,0025; ^{**b}: p=0,0036; ^{**c}: p=0,0039, significantes, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média. Fonte: elaborado pelo autor.

5.1.10 Volume corpuscular médio (VCM)

O volume corpuscular médio (VCM) não sofreu interferência nos grupos experimentais, não diferindo entre os grupos de tratamento e nem em relação ao controle, tanto em fêmeas quanto em machos.

E embora tenha ocorrido diferença significativa entre o VCM de machos e fêmeas em todos os grupos, esta diferença também ocorreu no grupo controle salina, não parecendo refletir, portanto, que tenha sido ocasionada pelo uso dos fármacos do estudo (Gráfico 32).

Gráfico 32 – Resultado da análise do volume corpuscular médio em fêmeas e machos. Comparação entre sexos (n=6 animais/grupo).



Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. *Valores de $p < 0,0001$ – significantes, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: elaborado pelo autor.

5.1.11 Hemoglobina corpuscular média (HCM)

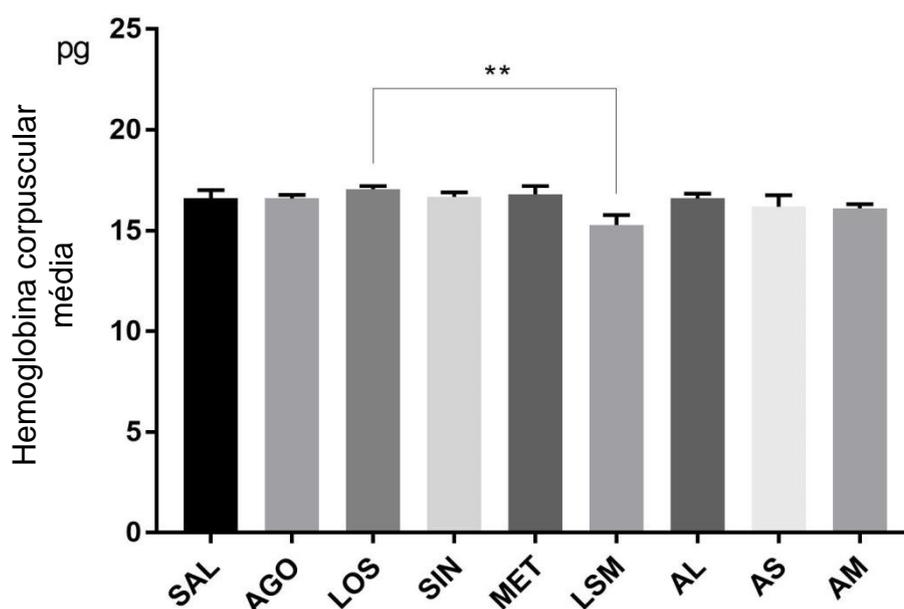
5.1.11.1 Fêmeas

A hemoglobina corpuscular média das fêmeas não sofreu alterações entre os grupos experimentais.

5.1.11.2 Machos

Animais machos em uso de três fármacos (losartana + sinvastatina + metformina) tiveram redução na hemoglobina corpuscular média em relação àqueles que utilizaram apenas losartana (Gráfico 33).

Gráfico 33 – Resultado da análise da hemoglobina corpuscular média em machos. Comparação dos grupos entre si (n=6 animais/grupo).



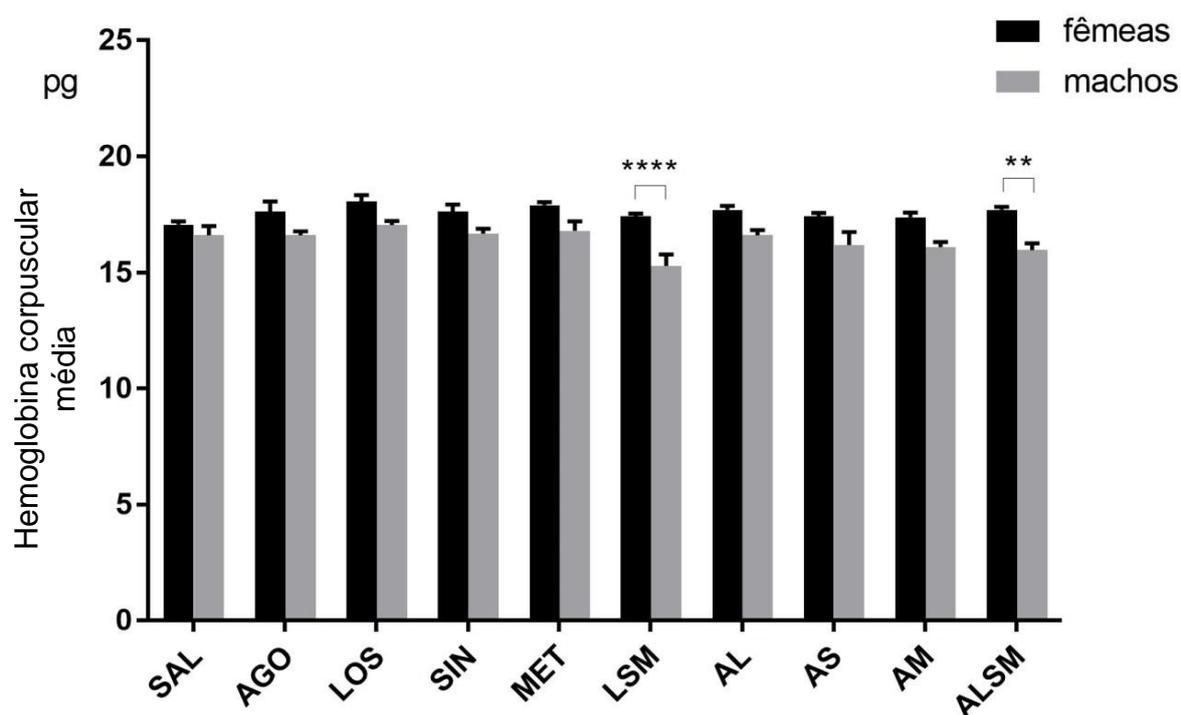
Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. **Valor de $p=0,0081$, significativo, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: elaborado pelo autor.

5.1.11.3 Comparação entre sexos

A diferença significativa na hemoglobina corpuscular média ocorreu nos grupos em uso de múltiplos fármacos (3 ou 4), sendo a HCM inferior nos machos em relação às fêmeas (Grupo 34).

Gráfico 34 – Resultado da análise da hemoglobina corpuscular média em fêmeas e machos. Comparação entre sexos (n=6 animais/grupo).



Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. Valores de p - **p=0,0024; ****p<0,0001, significantes, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: elaborado pelo autor.

5.1.12 Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)

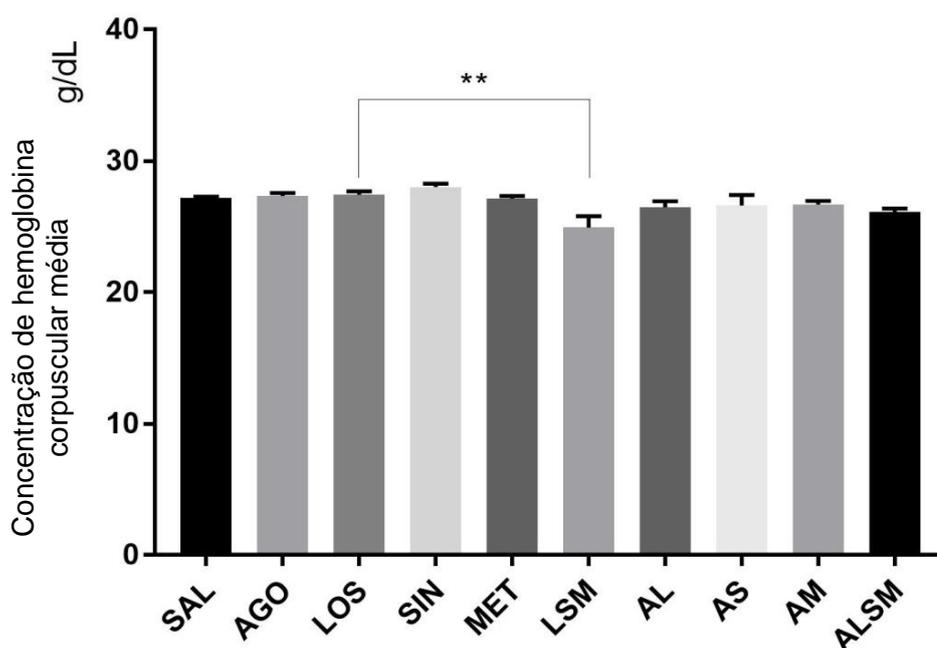
5.1.12.1 Fêmeas

O parâmetro CHCM nas fêmeas não sofreu interferência dos fármacos em uso, não havendo diferença significativa entre os grupos experimentais.

5.1.12.2 Machos

Animais machos em uso de três fármacos (losartana + sinvastatina + metformina) tiveram redução na concentração de hemoglobina corpuscular média em relação àqueles que utilizaram apenas losartana (Gráfico 35).

Gráfico 35 – Resultado da análise da concentração de hemoglobina corpuscular média em machos. Comparação dos grupos entre si (n=6 animais/grupo).



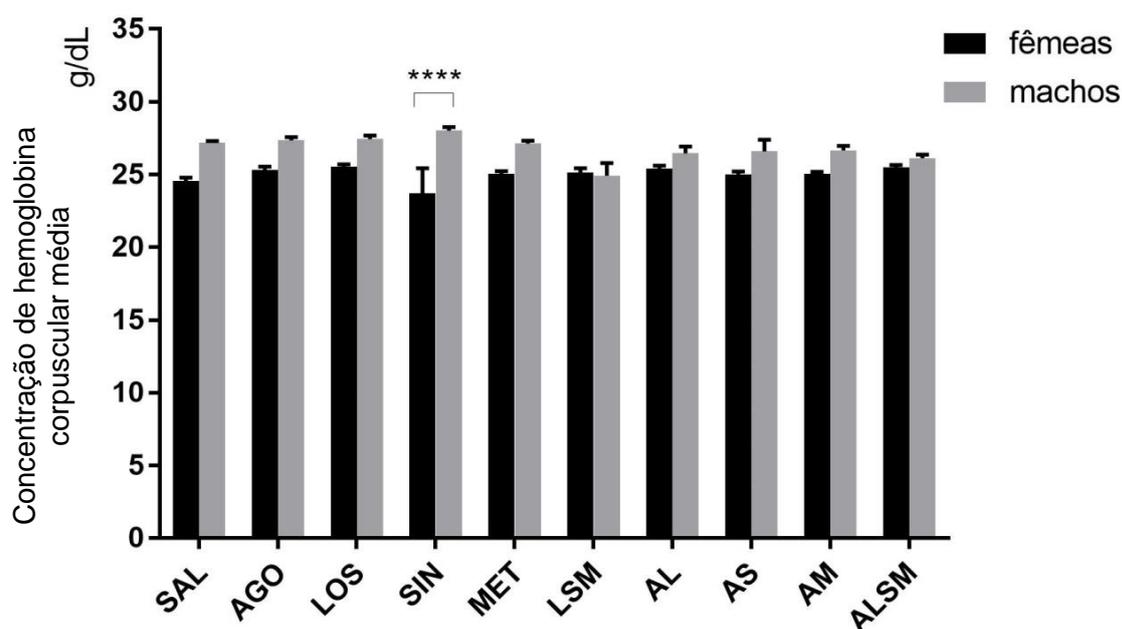
Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. **Valor de $p=0,0090$ – significativo, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: elaborado pelo autor.

5.1.12.3 Comparação entre sexos

A concentração de hemoglobina corpuscular média foi consideravelmente inferior ($p < 0,0001$) nas fêmeas em uso de sinvastatina em monoterapia, não havendo diferença de CHCM entre sexos em nenhum outro grupo experimental (Gráfico 36).

Gráfico 36 – Resultado da análise da concentração de hemoglobina corpuscular média em fêmeas e machos. Comparação entre sexos (n=6 animais/grupo).



Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. ****Valor de $p < 0,0001$ – significativo, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

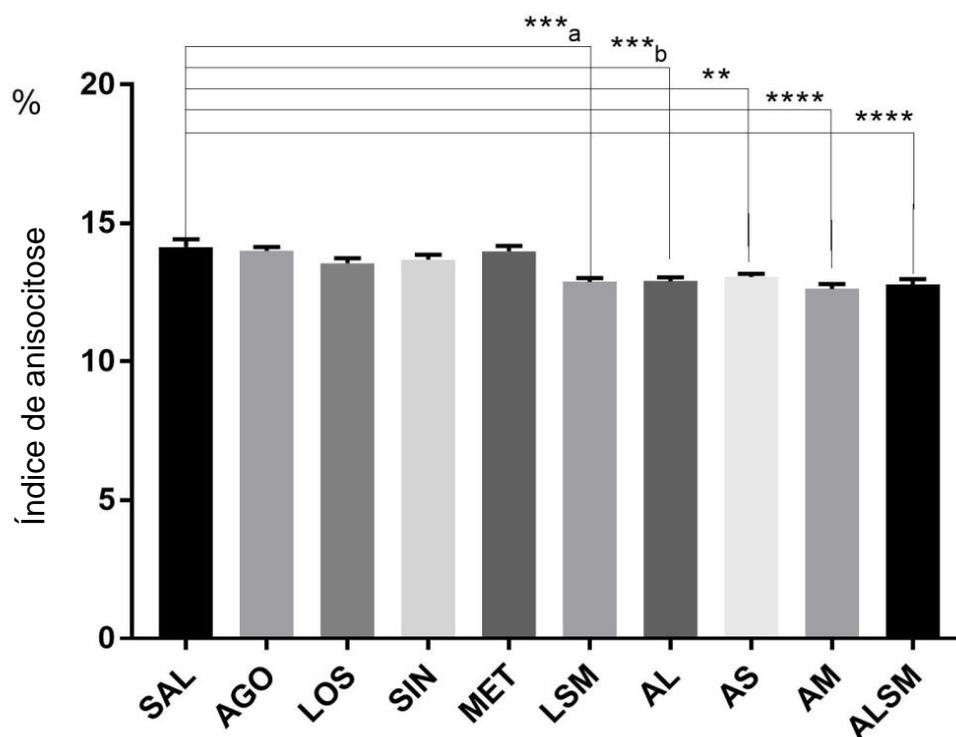
Fonte: elaborado pelo autor.

5.1.13 Índice de anisocitose (RDW)

5.1.13.1 Fêmeas

O índice de anisocitose (RDW) nas fêmeas foi significativamente menor nos grupos em uso das associações de fármacos do que nos animais do grupo controle salina (Gráfico 37).

Gráfico 37 – Resultado da análise do índice de anisocitose nos animais fêmeas. Comparação dos grupos de tratamento com o grupo controle salina (SAL) (n=6 animais/grupo).

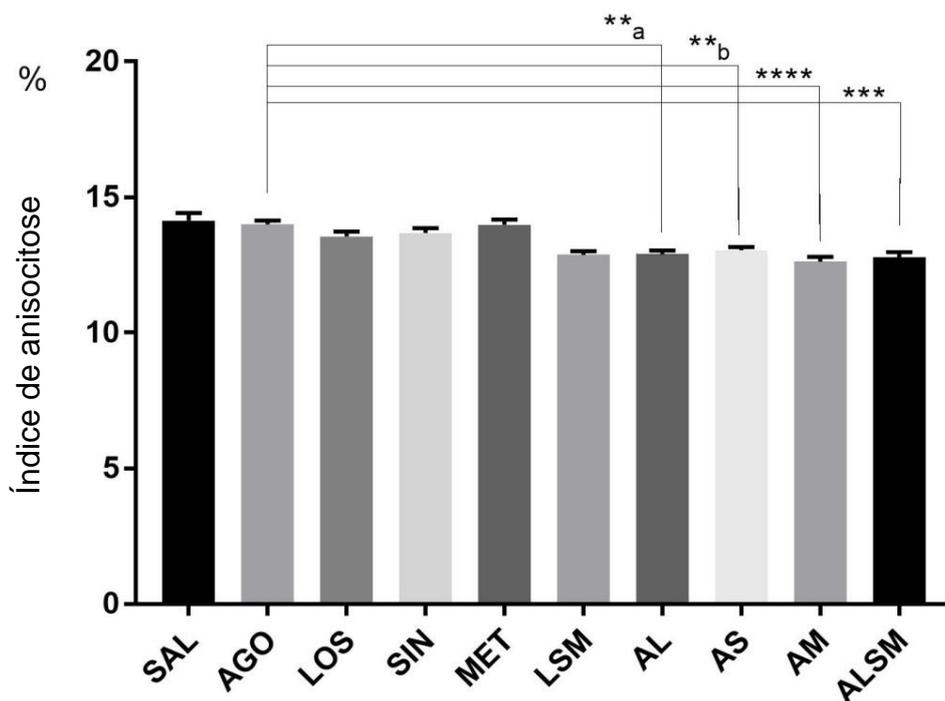


Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. Valores de p - **p=0,0030; ***a: p=0,003; ***b: p=0,0005; ****p<0,0001 – significantes, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: elaborado pelo autor.

Da mesma forma, os grupos de associações contendo agomelatina apresentaram menor RDW do que o grupo do fármaco isolado (Gráfico 38).

Gráfico 38 – Resultado da análise do índice de anisocitose nos animais fêmeas. Comparação do grupo agomelatina em monoterapia (AGO) com os grupos de associação da agomelatina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).

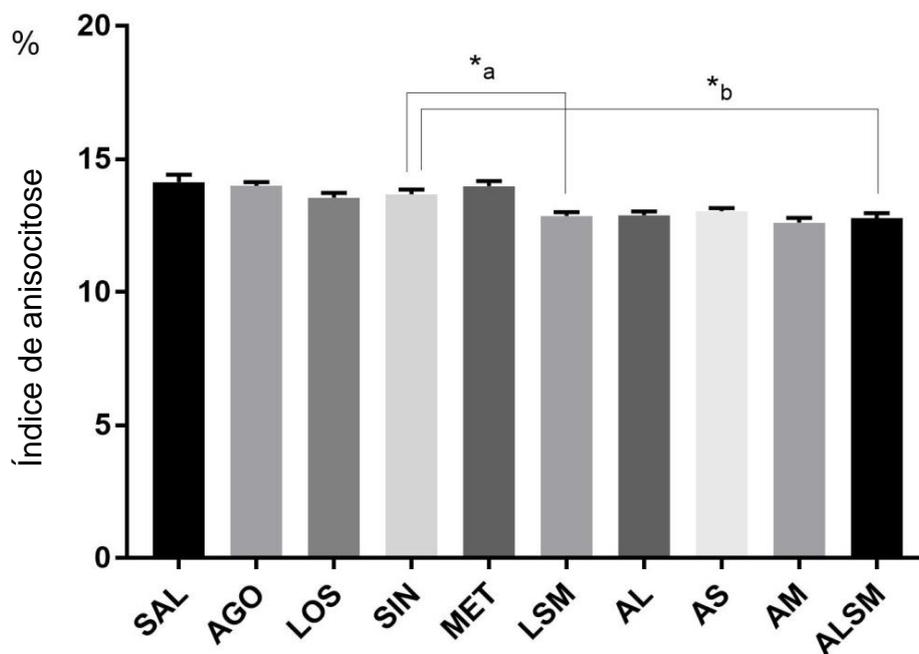


Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. Valores de p - **a: $p=0,0014$; **b: $p=0,0093$; *** $p=0,0003$; **** $p<0,0001$ – significantes, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: elaborado pelo autor.

A associação dos quatro fármacos resultou em redução de RDW em relação ao grupo em uso de sinvastatina isoladamente (Gráfico 39).

Gráfico 39 – Resultado da análise do índice de anisocitose nos animais fêmeas. Comparação do grupo sinvastatina em monoterapia (SIN) com os grupos de associação da sinvastatina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).

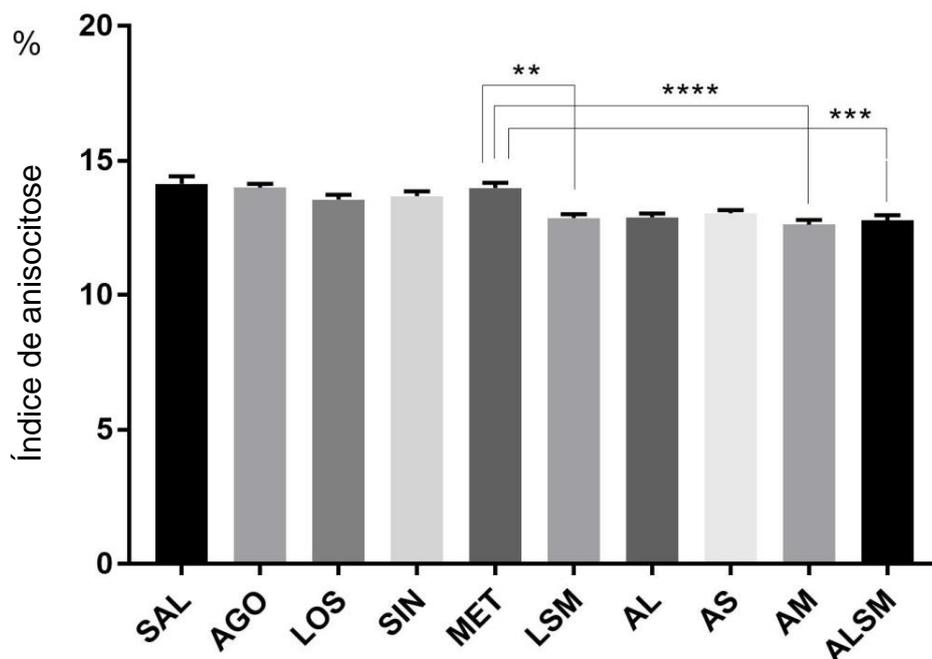


Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. Valores de p - *a: p=0,0427; *b: p=0,0168 – significantes, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: elaborado pelo autor.

Grupos de associações contendo metformina apresentaram menor RDW do que o grupo do fármaco isolado (Gráfico 40).

Gráfico 40 – Resultado da análise do índice de anisocitose nos animais fêmeas. Comparação do grupo metformina em monoterapia (MET) com os grupos de associação da metformina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).

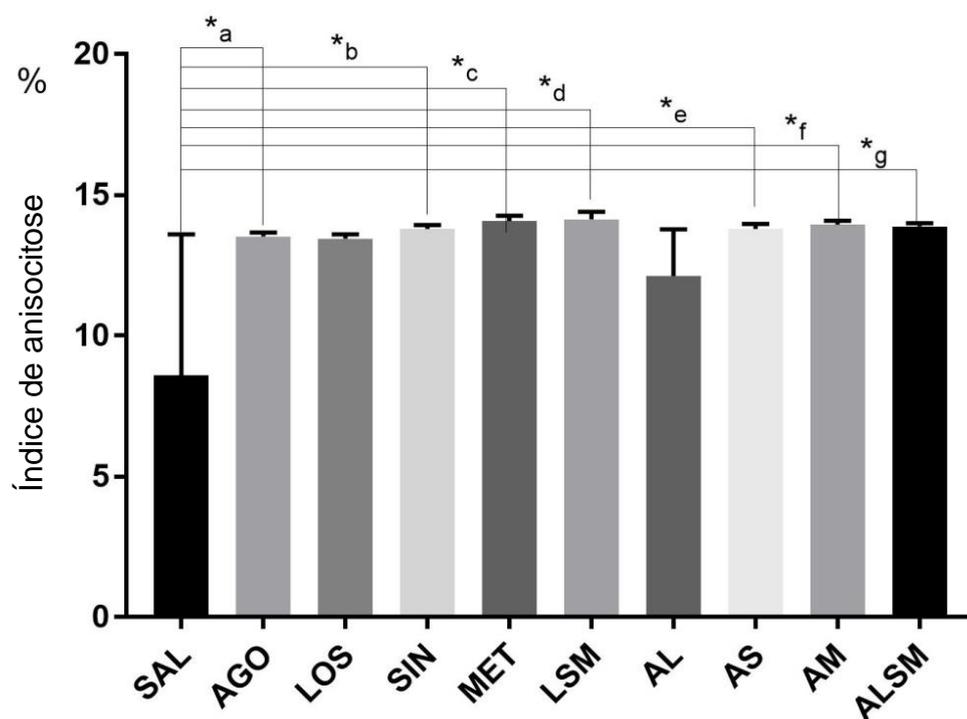


Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. Valores de p - **p=0,0011; ***p=0,0004; p<0,0001 – significantes, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média. Fonte: elaborado pelo autor.

5.1.13.2 Machos

Dentre os machos, ocorreu aumento do índice de anisocitose em quase todos os grupos em relação ao controle salina, exceto nos grupos losartana e agomelatina + losartana, como demonstrado no Gráfico 41.

Gráfico 41 – Resultado da análise do índice de anisocitose nos animais machos. Comparação dos grupos entre si (n=6 animais/grupo).



Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. *a *b *c *d *e *f *g Valores de $p < 0,05$ significantes, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: elaborado pelo autor.

5.1.13.3 Comparação entre sexos

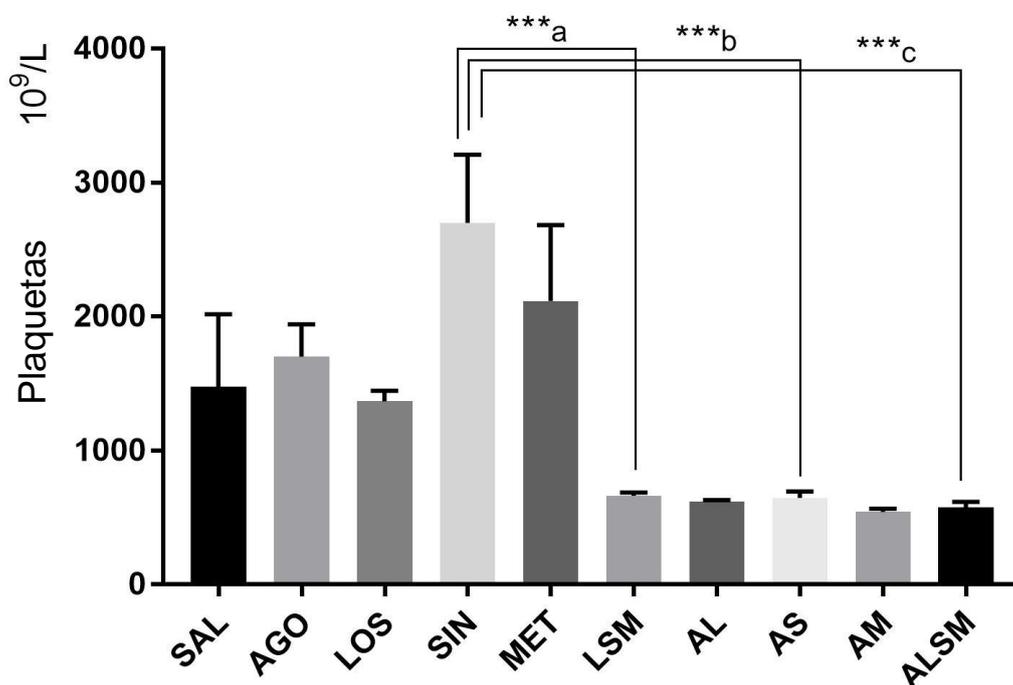
A comparação entre sexos não revelou achados relevantes em relação ao índice de anisocitose.

5.1.14 Contagem de plaquetas (PLT)

5.1.14.1 Fêmeas

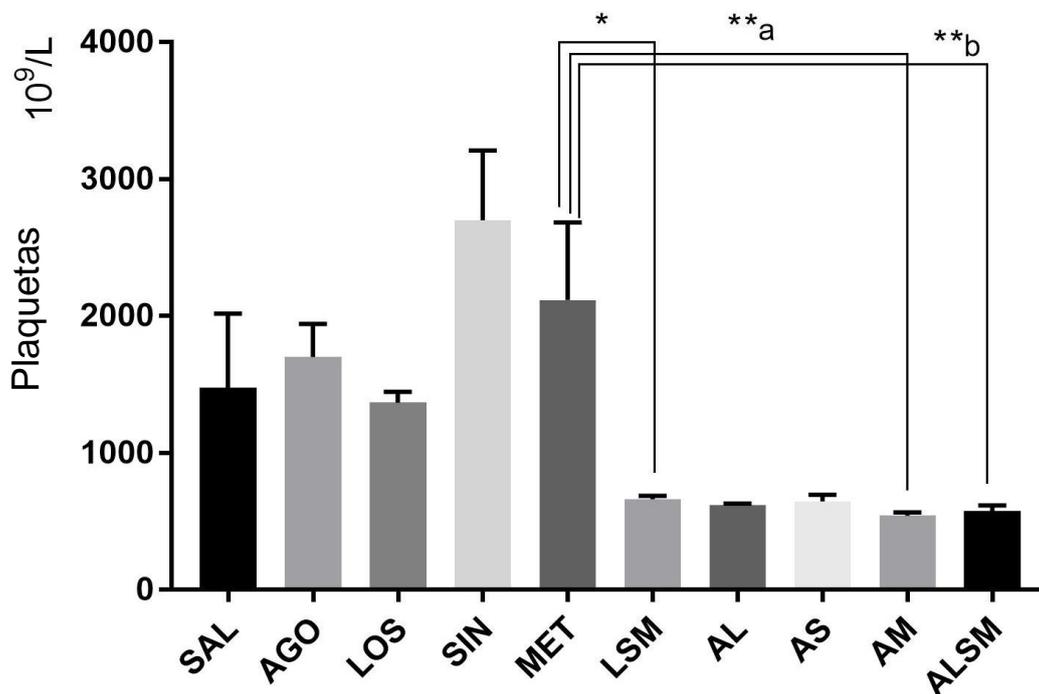
As fêmeas apresentaram diferenças significativas na contagem de plaquetas ao serem comparados os grupos que utilizaram sinvastatina e metformina em monoterapia com os respectivos grupos de suas combinações com os demais fármacos, conforme demonstrado nos Gráficos 42 e 43.

Gráfico 42 – Resultado da análise da contagem de plaquetas nos animais fêmeas. Comparação do grupo sinvastatina em monoterapia (SIN) com os grupos de associação da sinvastatina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).



Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. Valores de p - ***a: p=0,0004; ***b: p=0,0003; ***c: p=0,0002 – significantes, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média. Fonte: elaborado pelo autor.

Gráfico 43 – Resultado da análise da contagem de plaquetas nos animais fêmeas. Comparação do grupo metformina em monoterapia (MET) com os grupos de associação da metformina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).

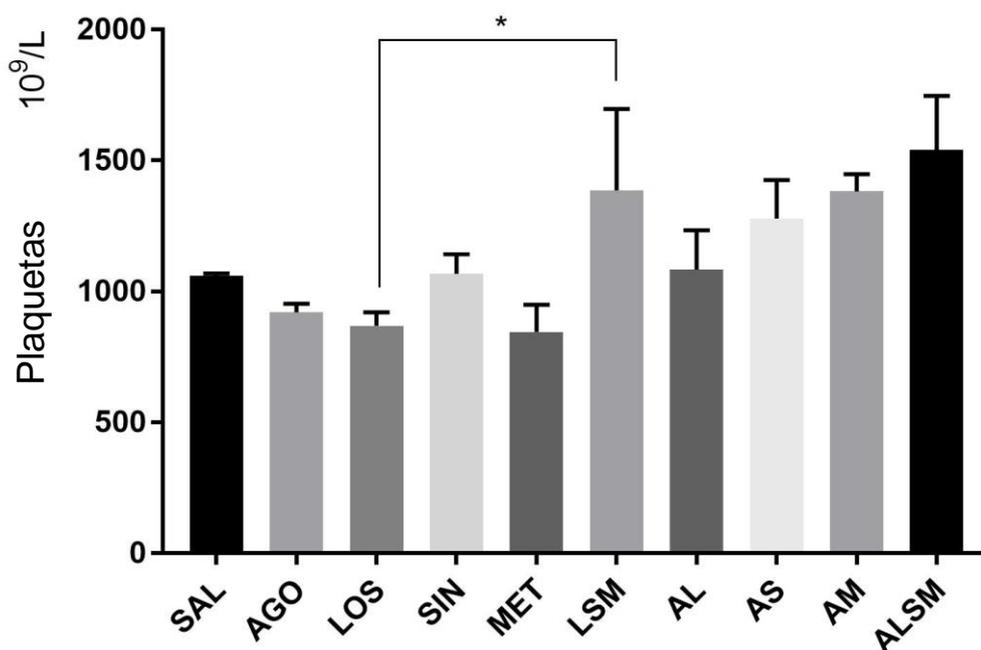


Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. Valores de p - *p=0,0161; **a: p=0,0066; **b: p=0,0086 – significantes, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média. Fonte: elaborado pelo autor.

5.1.14.2 Machos

Foi verificada diferença significativa na contagem de plaquetas entre os machos que utilizaram losartana em monoterapia quando comparados ao grupo em polifarmácia, onde a losartana foi associada a sinvastatina e metformina (Gráfico 44).

Gráfico 44 – Resultado da análise da contagem de plaquetas dos animais machos. Comparação dos grupos entre si (n=6 animais/grupo).



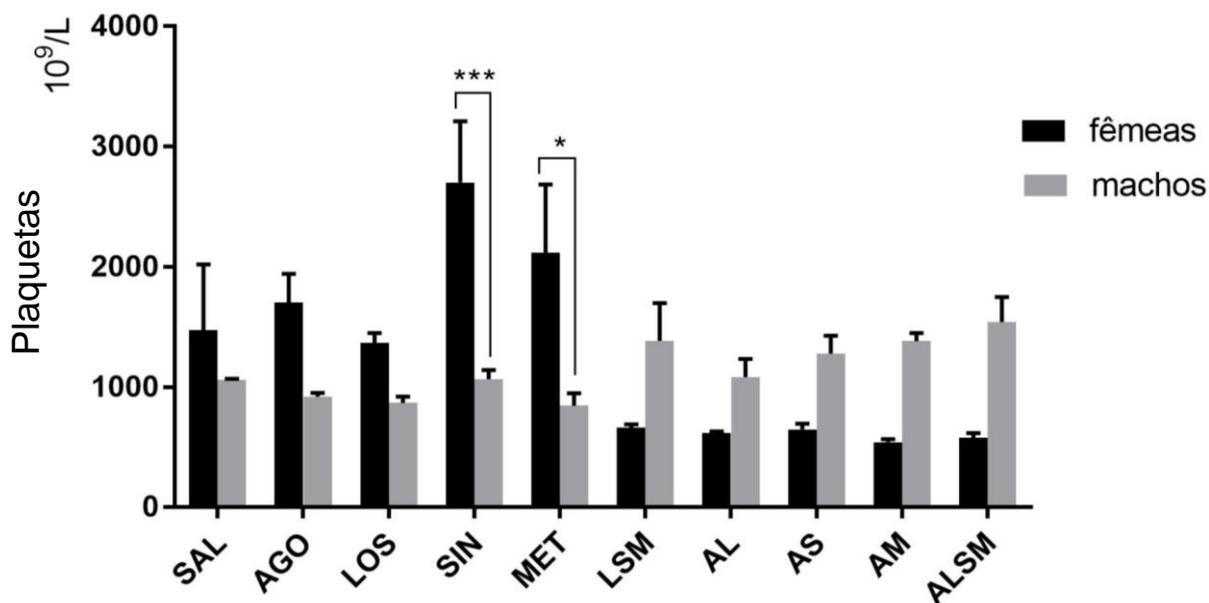
Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. *Valor de $p=0,0451$ – significante, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: elaborado pelo autor.

5.1.14.3 Comparação entre sexos

Os grupos em uso de sinvastatina e de metformina em monoterapia apresentaram diferenças significativas na contagem de plaquetas entre machos e fêmeas (Gráfico 45).

Gráfico 45 – Resultado da análise da contagem de plaquetas em fêmeas e machos. Comparação entre sexos (n=6 animais/grupo).



Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. Valores de p - *p=0,045; ***p=0,0004 – significantes, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: elaborado pelo autor.

5.1.15 Tabelas dos parâmetros hematológicos comparados entre sexos

As médias \pm erro padrão da média dos parâmetros hematológicos analisados comparados entre sexos estão demonstrados nas Tabelas 4 e 5, nas quais as comparações com diferença significativa entre fêmeas e machos, para mais ou para menos, encontram-se em negrito e sinalizadas com asterisco.

Pelas tabelas, é possível verificar que a maioria dos parâmetros hematológicos analisados (nove de quinze) apresentou diferença significativa entre sexos em pelo menos um dos grupos de tratamento (sem considerar salina).

Tabela 4 – Média \pm erro padrão da média dos parâmetros hematológicos analisados e comparação entre sexos dos grupos em monoterapia (G1 a G5).

Parâmetro (unidade)	G1/SAL		G2/AGO		G3/LOS		G4/SIN		G5/MET	
	fêmeas n=6	machos n=6								
Leucócitos ($10^9/L$)	9,78 \pm 1,29	9,17 \pm 1,78	12,78 \pm 1,39	8,09 \pm 1,33	7,04 \pm 0,31	8,07 \pm 0,37	13,88\pm2,49*	7,89\pm1,47*	9,70 \pm 0,62	11,3 \pm 1,38
Linfócitos ($10^9/L$)	8,83 \pm 1,32	7,72 \pm 1,59	11,30\pm1,19*	6,24\pm1,09*	6,20 \pm 0,22	6,27 \pm 0,27	13,25\pm2,32*	6,18\pm1,16*	8,75 \pm 0,64	9,00 \pm 1,34
Monóc/Eosinóf/Basóf ($10^9/L$)	0,36 \pm 0,11	0,16 \pm 0,12	0,51 \pm 0,24	0,70 \pm 0,14	0,21 \pm 0,05	0,73 \pm 0,06	0,20 \pm 0,07	0,57 \pm 0,16	0,28 \pm 0,03	0,61 \pm 0,06
Granulócitos ($10^9/L$)	0,59 \pm 0,08	1,28 \pm 0,09	0,96 \pm 0,45	1,16 \pm 0,17	0,56 \pm 0,14	1,07 \pm 0,14	0,57 \pm 0,17	1,14 \pm 0,18	0,68 \pm 0,15	1,70 \pm 0,18
Linfócitos (%)	89,60 \pm 2,95	84,20 \pm 0,90	89,10 \pm 3,35	76,57 \pm 1,63	88,27 \pm 1,49	77,87 \pm 1,52	94,60 \pm 1,16	78,18 \pm 1,53	90,17 \pm 1,77	78,78 \pm 2,91
Monóc/Eosinóf/Basófi (%)	3,98 \pm 1,62	1,55 \pm 0,95	3,35\pm1,33*	8,78\pm1,40*	2,97\pm0,64*	6,85\pm0,75*	1,35\pm0,41*	6,85\pm0,75*	2,80 \pm 0,20	5,75 \pm 0,96
Granulócitos (%)	6,42 \pm 1,35	1,28 \pm 0,09	7,50 \pm 3,67	1,16 \pm 0,17	8,75 \pm 1,57	1,07 \pm 0,14	4,05 \pm 1,18	1,14 \pm 0,18	7,12 \pm 1,65	1,69 \pm 0,18
Eritrócitos ($10^{12}/L$)	10,64 \pm 0,48	9,17 \pm 0,21	10,21 \pm 0,12	9,38 \pm 0,10	9,99 \pm 0,15	9,05 \pm 0,11	10,25 \pm 0,10	9,42 \pm 0,23	9,92 \pm 0,28	9,46 \pm 0,23
Hemoglobina (g/dL)	16,18 \pm 2,81	15,20 \pm 0,00	18,33\pm0,30*	9,38\pm0,10*	18,18\pm0,16*	9,05\pm0,11*	16,38 \pm 1,76	15,68 \pm 0,36	17,78\pm0,60*	9,46\pm0,23*
Hematócrito (%)	72,59 \pm 2,64	55,80 \pm 0,17	72,49\pm9,94*	56,94\pm0,37*	71,36\pm0,78*	56,13\pm0,55*	71,11\pm0,42*	55,96\pm1,15*	70,94 \pm 2,31	58,12 \pm 0,64
VCM (fL)	68,80\pm1,20*	61,00\pm1,00*	70,83\pm0,91*	60,67\pm0,49*	71,50\pm0,42*	61,83\pm0,87*	69,67\pm0,84*	59,50\pm0,42*	71,50\pm0,56*	61,50\pm1,56*
HCM (pg)	17,06 \pm 0,14	16,6 \pm 0,40	17,63 \pm 0,42	16,60 \pm 0,17	18,07 \pm 0,28	17,05 \pm 0,17	17,63 \pm 0,30	16,67 \pm 0,22	17,90 \pm 0,14	16,80 \pm 0,41
CHCM (g/dL)	24,56 \pm 0,23	27,20 \pm 0,10	25,30 \pm 0,24	27,35 \pm 0,21	25,52 \pm 0,18	27,45 \pm 0,24	23,73\pm1,70*	28,02\pm0,25*	25,07 \pm 0,17	27,13 \pm 0,20
RDW (%)	14,14\pm0,27*	8,60\pm5,00*	14,00 \pm 0,13	13,53 \pm 0,14	13,55 \pm 0,18	13,45 \pm 0,16	13,68 \pm 0,17	13,80 \pm 0,14	13,98 \pm 0,19	14,08 \pm 0,19
Plaquetas($10^9/L$)	1475 \pm 543,1	1060 \pm 9,5	1702 \pm 239,8	920,2 \pm 32,63	1368 \pm 80,22	868,8 \pm 51,21	2701\pm508*	1067\pm75,3*	2117\pm568*	845,3\pm104*

Legenda: G1/SAL: grupo controle salina; G2/AGO: grupo agomelatina; G3/LOS: grupo losartana; G4/SIN: grupo sinvastatina; G5/MET: grupo metformina; VCM: volume corpuscular médio. HCM: hemoglobina corpuscular média. CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média. RDW: amplitude de distribuição das hemácias. *Valores de $p < 0,05$ significantes, de acordo com o teste de Tukey.

Fonte: elaborada pelo autor.

Tabela 5 – Média \pm erro padrão da média dos parâmetros hematológicos analisados e comparação entre sexos – grupos em uso de combinações de fármacos (G6 a G10).

Parâmetro (unidade)	G6/LSM		G7/AL		G8/AS		G9/AM		G10/ALSM	
	fêmeas n=6	machos n=6								
Leucócitos ($10^9/L$)	8,09 \pm 0,70	8,19 \pm 1,09	6,87 \pm 0,79	9,62 \pm 0,98	5,82 \pm 0,82	5,98 \pm 1,64	7,35 \pm 0,33	9,53 \pm 0,71	7,10 \pm 0,68	9,60 \pm 0,76
Linfócitos ($10^9/L$)	7,31 \pm 0,68	6,41 \pm 0,81	6,03 \pm 0,72	7,97 \pm 0,80	5,02 \pm 0,99	4,88 \pm 1,29	6,46 \pm 0,37	7,78 \pm 0,52	5,64 \pm 0,62	7,54 \pm 0,42
Monóc/Eosinóf/Basóf ($10^9/L$)	0,21 \pm 0,06	0,41 \pm 0,13	0,19 \pm 0,02	0,60 \pm 0,19	0,15 \pm 0,06	0,32 \pm 0,13	0,18 \pm 0,38	0,39 \pm 0,12	0,19 \pm 0,03	0,64 \pm 0,18
Granulócitos ($10^9/L$)	0,58 \pm 0,14	1,39 \pm 0,19	0,64 \pm 0,18	1,05 \pm 0,15	0,65 \pm 0,30	0,78 \pm 0,23	0,70 \pm 0,14	1,36 \pm 0,17	1,28 \pm 0,68	1,41 \pm 0,21
Linfócitos (%)	91,12 \pm 2,23	78,70 \pm 1,15	87,87 \pm 2,36	83,08 \pm 2,47	82,65 \pm 8,4	83,38 \pm 2,13	87,17 \pm 2,4	81,88 \pm 1,80	80,92 \pm 7,12	77,72 \pm 2,50
Monóc/Eosinóf/Basófi (%)	2,42 \pm 0,56	4,68 \pm 1,18	2,98 \pm 0,37	5,88 \pm 1,42	2,92 \pm 1,33	4,48 \pm 1,08	2,53 \pm 0,53	3,93 \pm 0,94	2,62 \pm 0,42	6,33 \pm 1,41
Granulócitos (%)	7,47 \pm 1,69	1,39 \pm 1,19	9,38 \pm 2,22	1,05 \pm 0,15	14,42 \pm 8,73	0,78 \pm 0,23	9,61 \pm 1,90	1,36 \pm 0,17	16,47 \pm 7,39	1,41 \pm 0,21
Eritrócitos ($10^{12}/L$)	7,94 \pm 0,21	8,85 \pm 0,86	7,91 \pm 0,18	8,10 \pm 0,59	7,84 \pm 0,17	6,65 \pm 1,42	7,79 \pm 0,19	8,93 \pm 0,11	7,56 \pm 0,19	8,91 \pm 0,20
Hemoglobina (g/dL)	13,83\pm0,37*	8,85\pm0,86*	13,95\pm0,26*	8,10\pm0,59*	13,65 \pm 0,32	11,48 \pm 2,05	13,53 \pm 0,18	14,4 \pm 0,14	13,38 \pm 0,31	14,23 \pm 0,32
Hematócrito (%)	54,77 \pm 1,09	54,07 \pm 5,09	55,05 \pm 1,28	50,73 \pm 3,50	54,63\pm1,29*	40,15\pm8,47*	54,03 \pm 0,96	53,99 \pm 0,55	52,53 \pm 1,28	54,47 \pm 0,80
VCM (fL)	69,00\pm0,51*	61,50\pm0,67*	69,67\pm0,33*	62,67\pm0,56*	69,83\pm0,87*	60,60\pm0,60*	69,33\pm0,76*	60,33\pm0,67*	69,67\pm0,33*	61,17\pm0,75*
HCM (pg)	17,43\pm0,10*	15,28\pm0,49*	17,70 \pm 0,17	16,60 \pm 0,24	17,43 \pm 0,14	16,18 \pm 0,57	17,38 \pm 0,20	16,10 \pm 0,21	17,70\pm0,13*	15,97\pm0,29*
CHCM (g/dL)	25,15 \pm 0,29	24,93 \pm 0,85	25,38 \pm 0,23	26,47 \pm 0,46	25,00 \pm 0,21	26,60 \pm 0,80	25,03 \pm 0,16	26,67 \pm 0,30	25,48 \pm 0,18	26,12 \pm 0,27
RDW (%)	12,87 \pm 0,14	14,13 \pm 0,26	12,90 \pm 0,14	12,12 \pm 1,67	13,05 \pm 0,11	13,80 \pm 0,17	12,62 \pm 0,18	13,95 \pm 0,13	12,78 \pm 0,19	13,88 \pm 0,11
Plaquetas($10^9/L$)	662,3 \pm 25,31	1386 \pm 311,1	618,2 \pm 13,07	1083 \pm 150,7	646,2 \pm 49,04	1280 \pm 146,1	541,5 \pm 24,93	1383 \pm 65,13	576,8 \pm 39,38	1541 \pm 205,8

Legenda: G6/LSM: grupo losartana + sinvastatina + metformina; G7/AL: grupo agomelatina + losartana; G8/AS: grupo agomelatina + sinvastatina; G9/AM: grupo agomelatina + metformina; G10/ALSM: grupo agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. VCM: volume corpuscular médio. HCM: hemoglobina corpuscular média. CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média. RDW: amplitude de distribuição das hemácias. *Valores de $p < 0,05$ significantes, de acordo com o teste de Tukey.

Fonte: elaborada pelo autor.

5.2 Resultados das análises bioquímicas

Os parâmetros bioquímicos foram analisados separadamente por sexo, comparando-se os grupos experimentais entre si, bem como fazendo a comparação de cada parâmetro entre os sexos. Deste modo, foram avaliados: colesterol total, triglicérides, bilirrubina total, bilirrubina direta, fosfatase alcalina, Gama glutamil transpeptidase (gama GT), alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), glicose, ureia e creatinina.

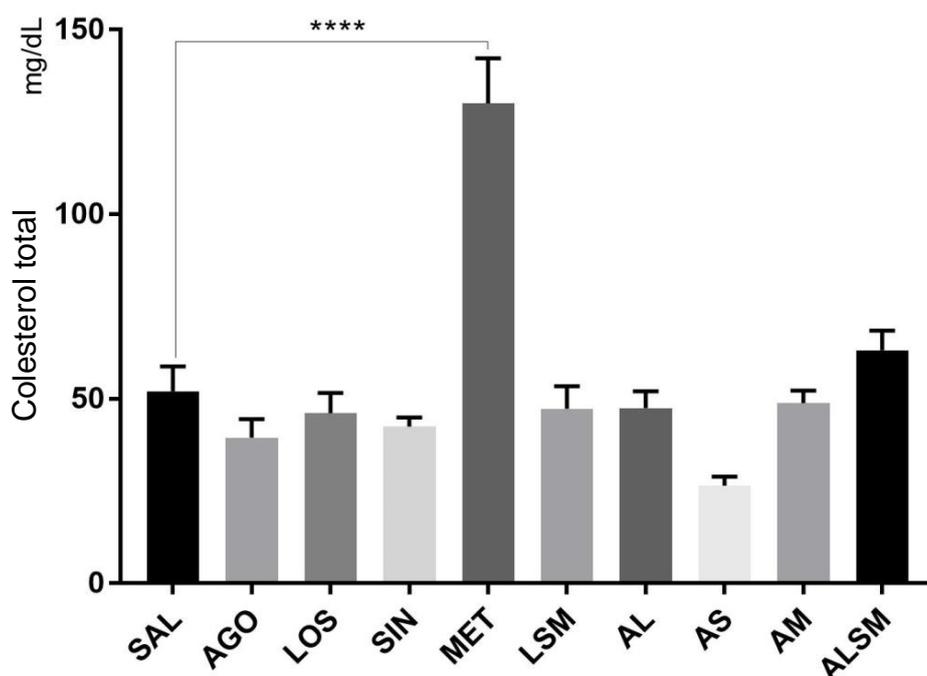
A seguir, serão apresentados os Gráficos e a tabela resultantes das análises de cada parâmetro bioquímico por sexo e de cada parâmetro comparado entre sexos, tendo sido considerados como significantes os valores de $p < 0,05$.

5.2.1 Colesterol total

5.2.1.1 Fêmeas

As fêmeas em uso de metformina tiveram elevação bastante significativa ($p < 0,0001$) do colesterol total em relação ao grupo controle salina, conforme se observa no Gráfico 46, não ocorrendo esta elevação em nenhum outro grupo de tratamento. O grupo em uso do hipolipemiante sinvastatina não teve redução significativa em relação ao grupo controle sem tratamento.

Gráfico 46 – Resultado da análise do colesterol total nos animais fêmeas. Comparação dos grupos de tratamento com o grupo controle salina (SAL) (n=6 animais/grupo).

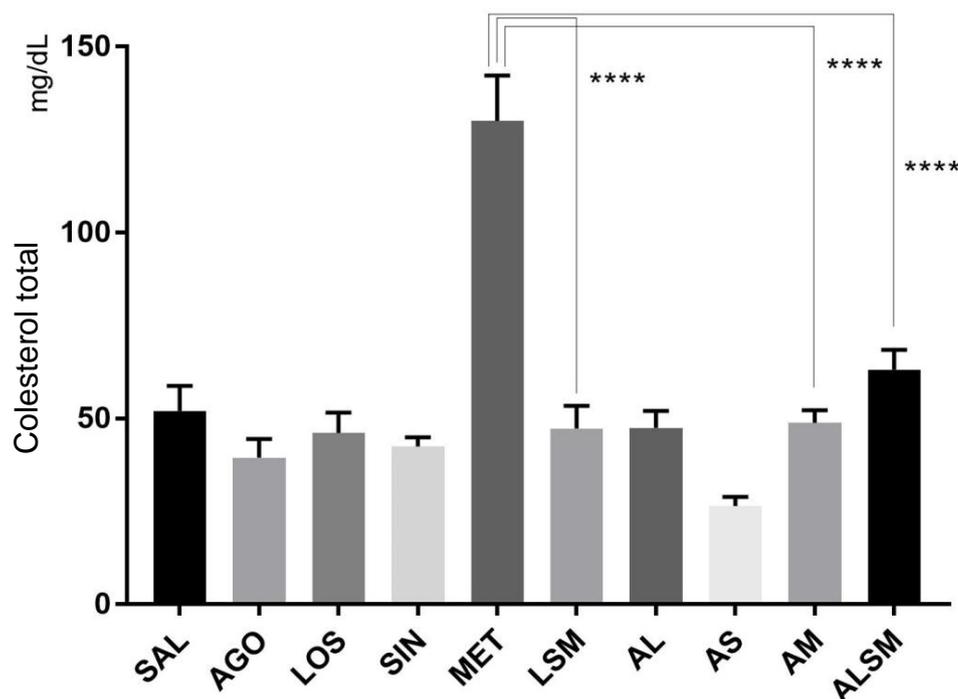


Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. ****Valor de $p < 0,0001$ – significativo, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: elaborado pelo autor.

A comparação entre grupos também revelou que o grupo em uso de metformina em monoterapia teve elevação do colesterol total significante ($p < 0,0001$) em relação aos grupos em que a metformina foi utilizada em associação a um, dois ou três fármacos do estudo (Gráfico 47).

Gráfico 47 – Resultado da análise do colesterol total nos animais fêmeas. Comparação do grupo metformina em monoterapia (MET) com os grupos de associação da metformina com outros fármacos ($n=6$ animais/grupo).



Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. ****Valores de $p < 0,0001$ – significantes, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: elaborado pelo autor.

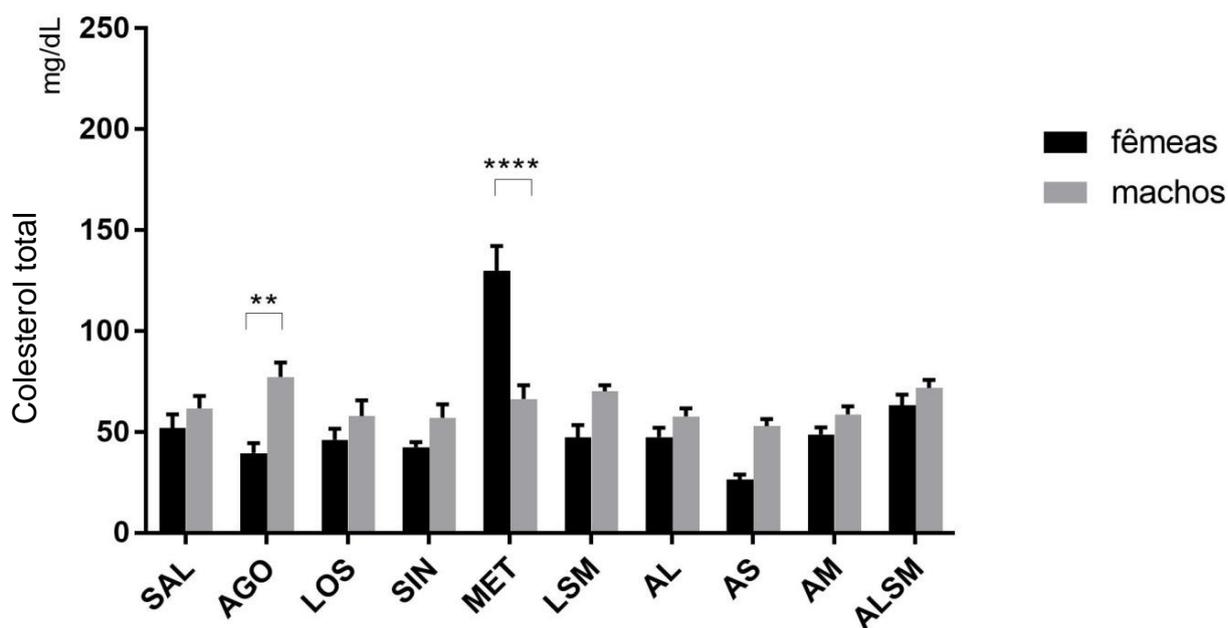
5.2.1.2 Machos

Dentre os machos, não ocorreram diferenças no parâmetro colesterol total na comparação entre os grupos.

5.2.1.3 Comparação entre sexos

A comparação entre sexos mostrou que os machos tratados com agomelatina tiveram colesterol total significamente elevado em relação às fêmeas ($p < 0,05$), enquanto no grupo em uso de metformina ocorreu o inverso, com as fêmeas apresentando maiores taxas de colesterol do que os machos (Gráfico 48).

Gráfico 48 – Resultado da análise do colesterol total em fêmeas e machos. Comparação entre sexos (n=6 animais/grupo).



Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. Valores de p : ** $p=0,0017$; **** $p<0,0001$, significantes, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

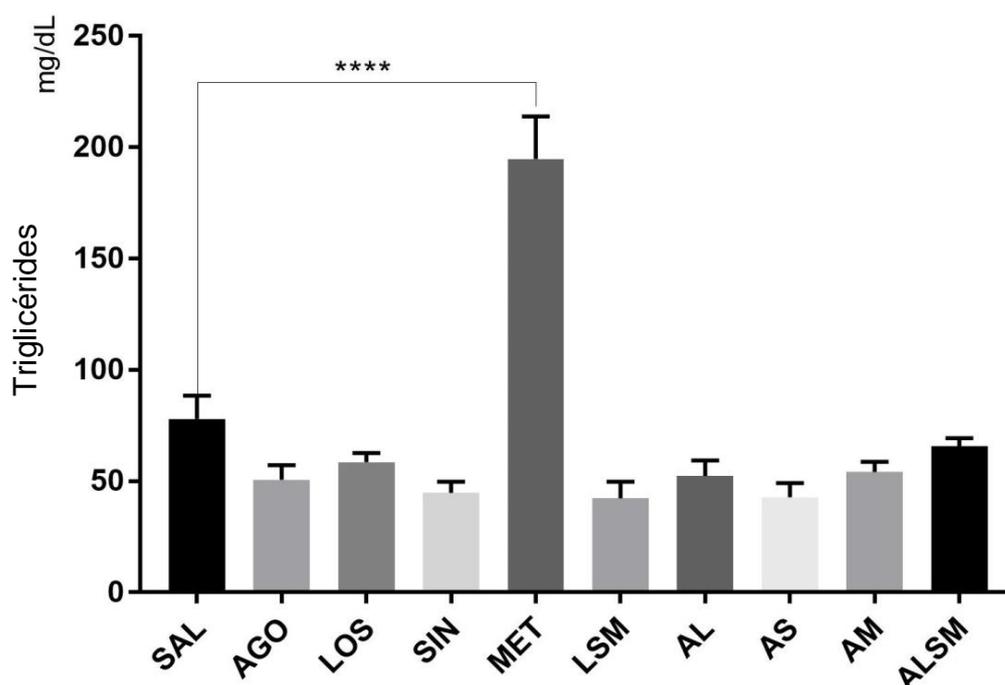
Fonte: elaborado pelo autor.

5.2.2 Triglicérides

5.2.2.1 Fêmeas

As fêmeas do grupo em uso de metformina apresentaram significativa elevação dos triglicérides em relação ao controle salina ($p < 0,0001$), conforme demonstra o Gráfico 49.

Gráfico 49 – Resultado da análise dos triglicérides nos animais fêmeas. Comparação dos grupos de tratamento com o grupo controle salina (SAL) (n=6 animais/grupo).

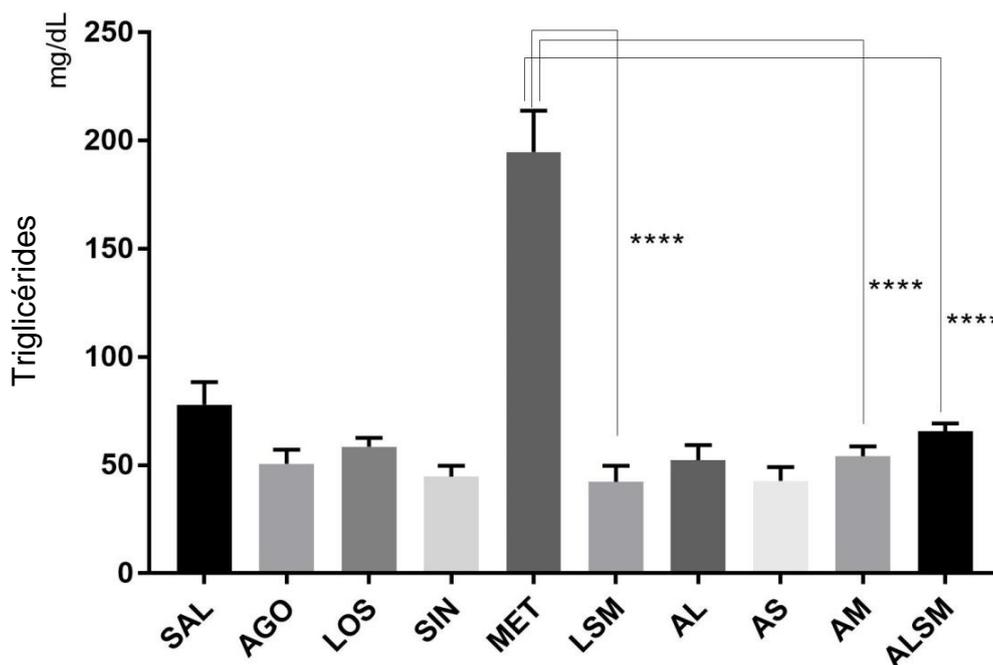


Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. ****Valor de $p < 0,0001$ – significativo, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: elaborado pelo autor.

Do mesmo modo, o grupo de fêmeas utilizando metformina em monoterapia apresentou a taxa de triglicérides superior àqueles grupos em uso da metformina associada aos demais fármacos do estudo (Gráfico 50).

Gráfico 50 – Resultado da análise de triglicérides nos animais fêmeas. Comparação do grupo metformina em monoterapia (MET) com os grupos de associação da metformina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).



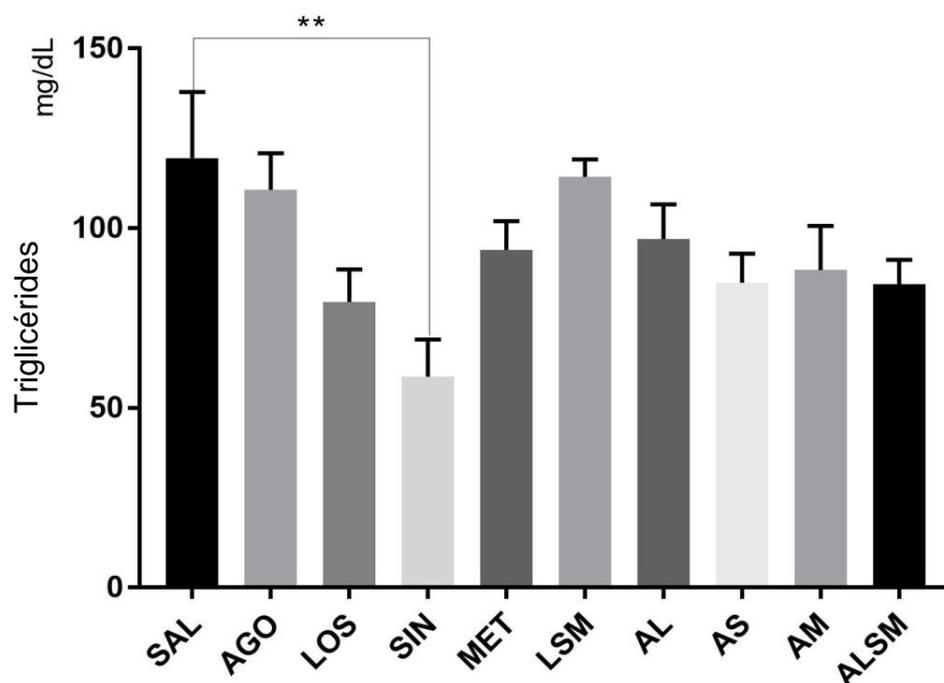
Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. ****Valores de $p < 0,0001$ – significantes, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: elaborado pelo autor.

5.2.2.2 Machos

Os machos tiveram a taxa de triglicérides significativamente menor quando em uso de sinvastatina isoladamente, em comparação ao grupo controle salina (Gráfico 51).

Gráfico 51 – Resultado da análise dos triglicérides nos animais machos. Comparação dos grupos de tratamento com o grupo controle salina (SAL) (n=6 animais/grupo).

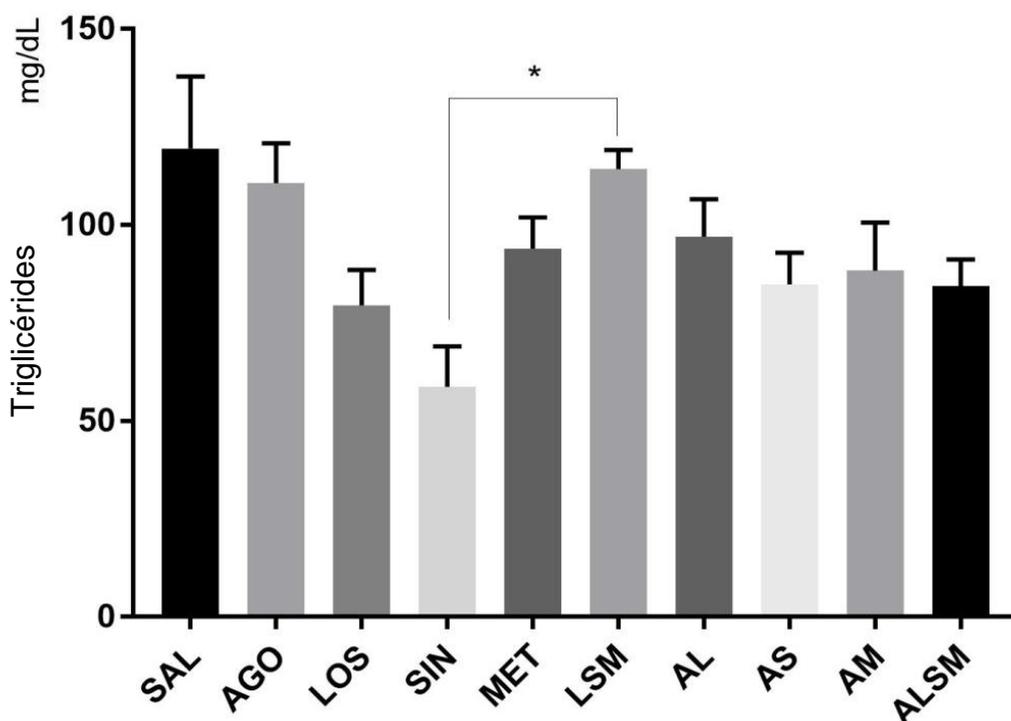


Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. **Valor de $p=0,0047$ – significativo, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: elaborado pelo autor.

A comparação entre o grupo em uso de sinvastatina em monoterapia com os grupo em que ela foi associada a outros fármacos demonstrou que, em associação com losartana e metformina, a sinvastatina não teve um bom controle dos triglicérides em relação ao seu uso isoladamente, demonstrando interação entre os três fármacos que culminou na redução da atividade hipolipemiante da sinvastatina nos machos (Gráfico 52).

Gráfico 52 – Resultado da análise de triglicérides nos animais machos. Comparação do grupo sinvastatina em monoterapia (SIN) com os grupos de associação da sinvastatina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).



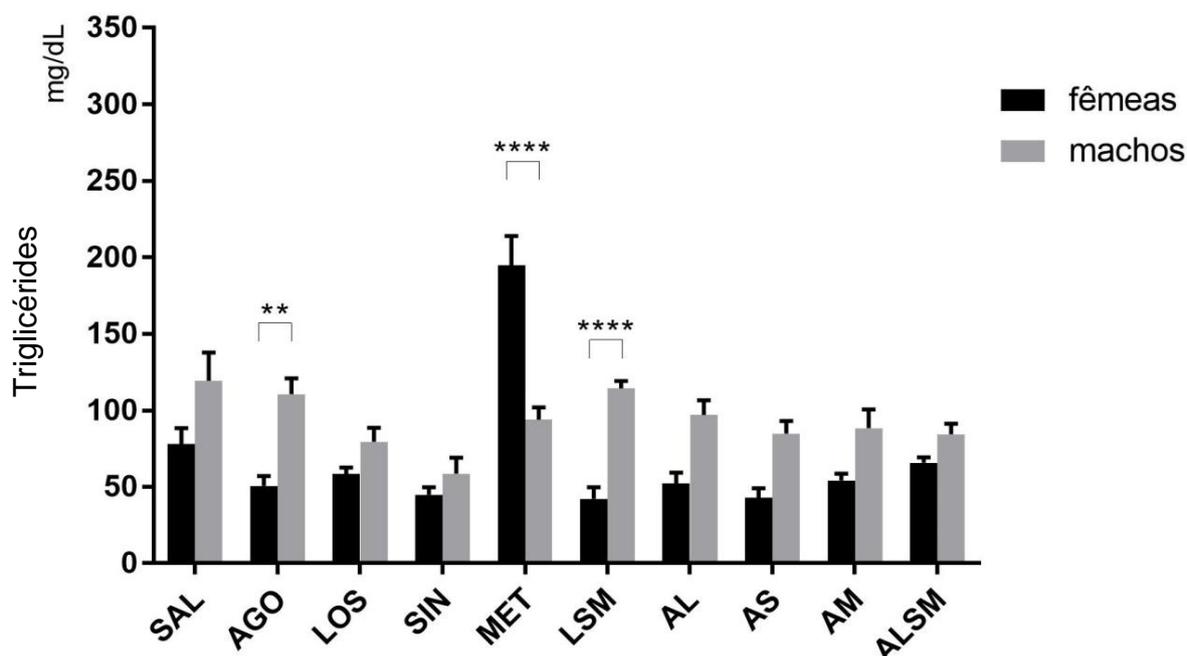
Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. *Valor de $p=0,0135$ – significativo, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: elaborado pelo autor.

5.2.2.3 Comparação entre sexos

Diferenças significativas entre os sexos nas taxas de triglicérides foram verificadas nos grupos em uso de agomelatina e no grupo em uso de três fármacos (LSM), com taxas maiores entre os machos, bem como no grupo em uso de metformina, neste grupo sendo a taxa das fêmeas maior que a dos machos (Gráfico 53).

Gráfico 53 – Resultado da análise de triglicérides em fêmeas e machos. Comparação entre sexos (n=6 animais/grupo).



Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. Valores de p: **p=0,0033; ****p<0,0001 – significantes, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

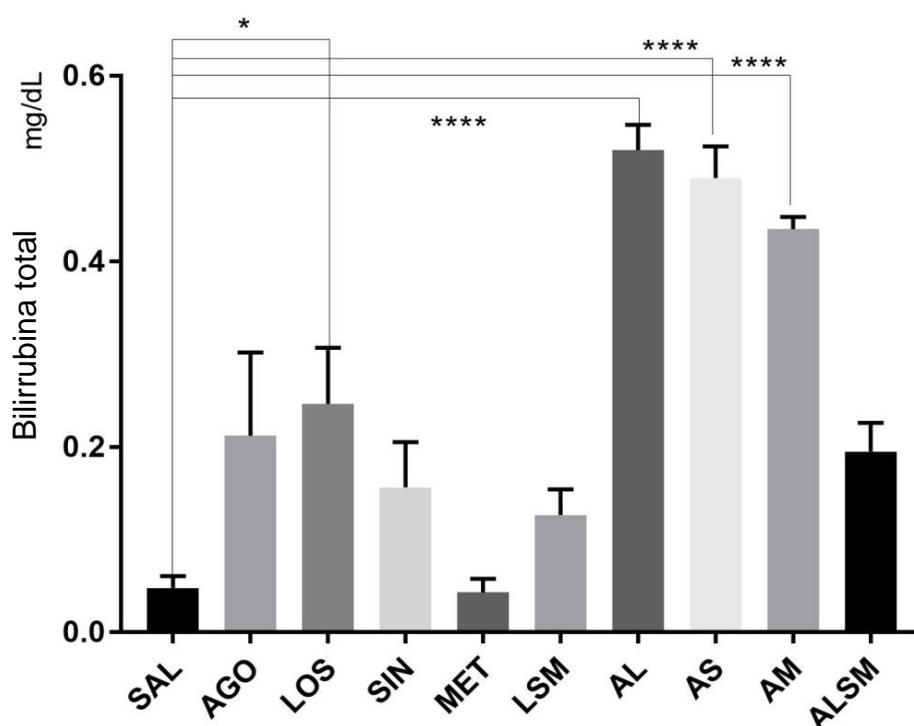
Fonte: elaborado pelo autor.

5.2.3 Bilirrubina total

5.2.3.1 Fêmeas

Vários grupos de fêmeas apresentaram elevação significativa de bilirrubina total em relação ao grupo controle salina, entre eles, o grupo losartana em monoterapia ($p < 0,05$) e os grupos de associações de agomelatina com losartana, sinvastatina e metformina ($p < 0,0001$) (Gráfico 54).

Gráfico 54 – Resultado da análise da bilirrubina total nos animais fêmeas. Comparação dos grupos de tratamento com o grupo controle salina (SAL) ($n=6$ animais/grupo).

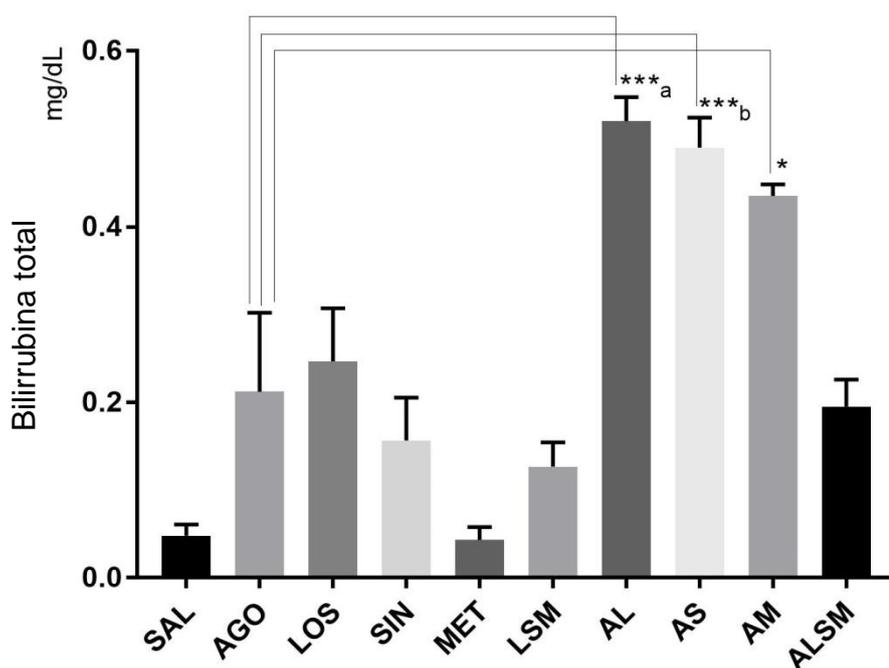


Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. Valores de p - * $p=0,0295$; **** $p < 0,0001$ – significantes, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: elaborado pelo autor.

Comparando a agomelatina em monoterapia com os três grupos em que este fármaco foi utilizado em terapia dupla com outro fármaco, observou-se que as associações culminaram em elevação significativa da taxa de bilirrubina direta entre os animais fêmeas, de acordo com o que se observa no Gráfico 55.

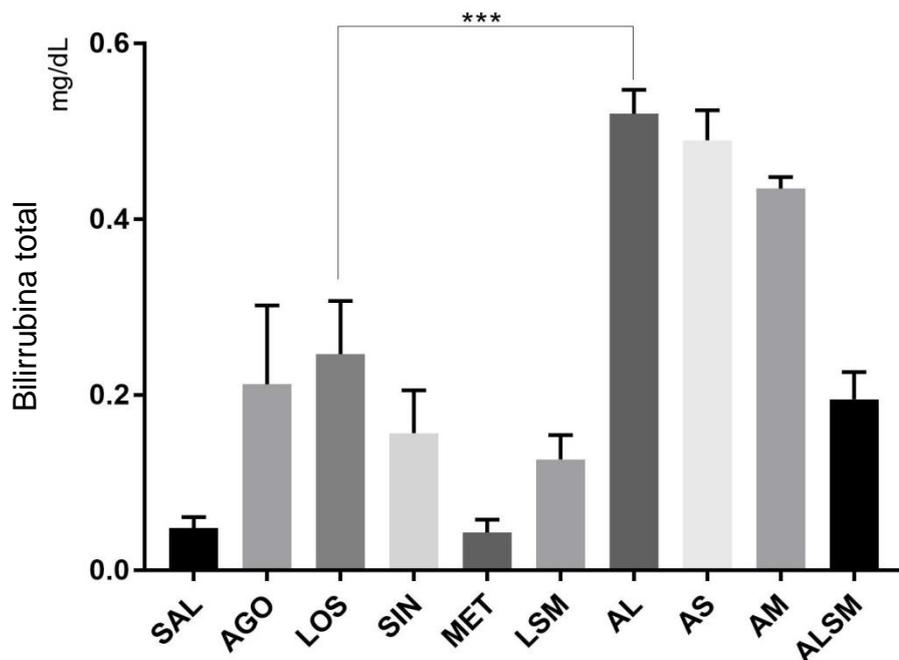
Gráfico 55 – Resultado da análise de bilirrubina total nos animais fêmeas. Comparação do grupo agomelatina em monoterapia (AGO) com os grupos de associação da agomelatina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).



Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. Valores de * $p=0,0146$; ***a: $p=0,0002$; ***b: $p=0,0008$ – significantes, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média. Fonte: elaborado pelo autor.

A losartana quando associada à agomelatina culminou na elevação significativa da bilirrubina total nos animais fêmeas em relação a seu uso isoladamente (Gráfico 56).

Gráfico 56 – Resultado da análise de bilirrubina total nos animais fêmeas. Comparação do grupo losartana em monoterapia (LOS) com os grupos de associação da losartana com outros fármacos (n=6 animais/grupo).

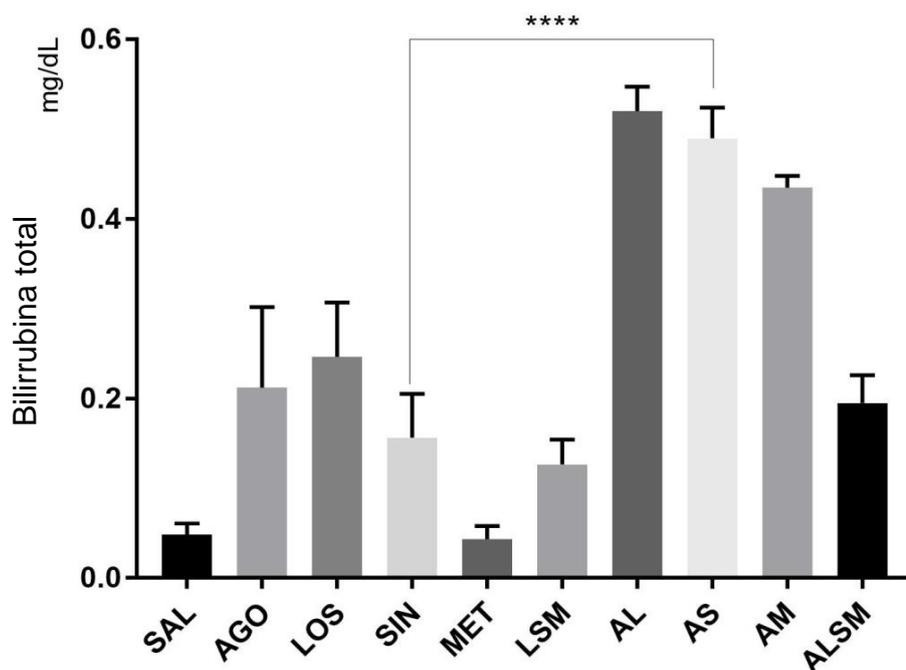


Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. ***Valor de $p=0,0005$ – significativo, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: elaborado pelo autor.

Também a sinvastatina quando associada à agomelatina culminou na elevação significativa da bilirrubina total nos animais fêmeas em relação a seu uso isoladamente, o mesmo ocorrendo com a metformina (Gráficos 57 e 58).

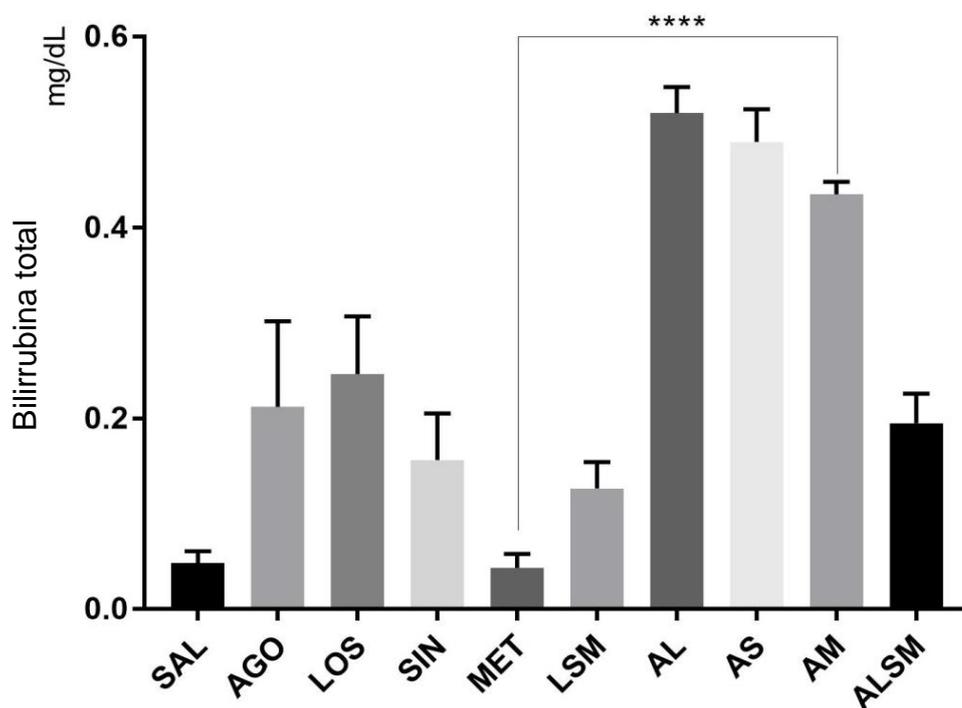
Gráfico 57 – Resultado da análise de bilirrubina total nos animais fêmeas. Comparação do grupo sinvastatina em monoterapia (SIN) com os grupos de associação da sinvastatina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).



Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. ****Valor de $p < 0,0001$ – significativo, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: elaborado pelo autor.

Gráfico 58 – Resultado da análise de bilirrubina total nos animais fêmeas. Comparação do grupo metformina em monoterapia (MET) com os grupos de associação da metformina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).

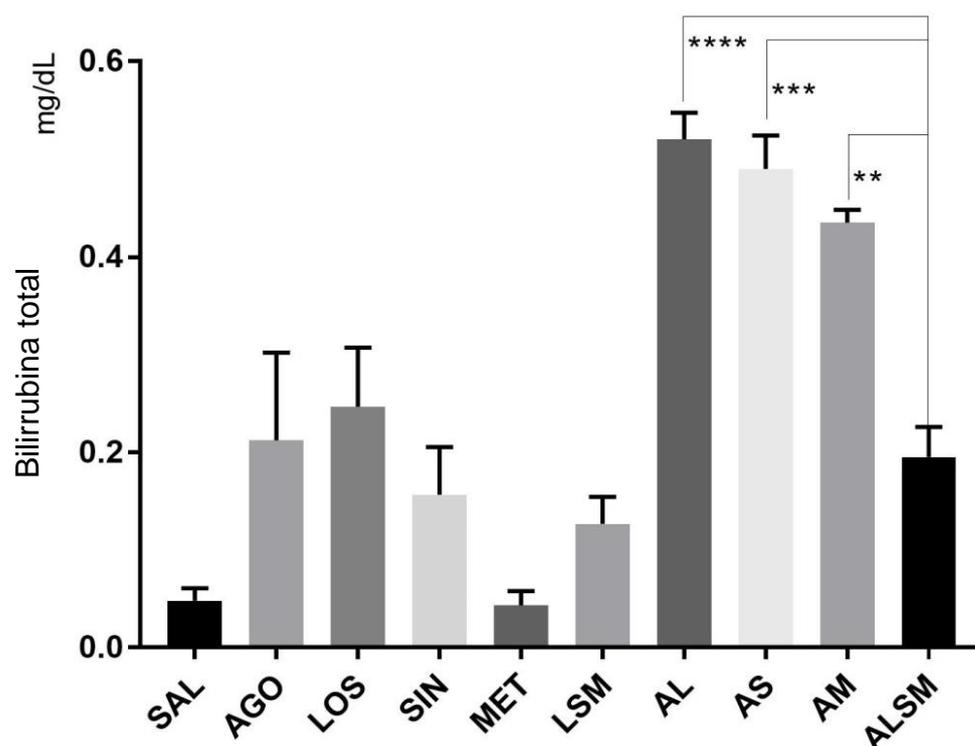


Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. ****Valor de $p < 0,0001$ – significativo, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: elaborado pelo autor.

A associação dos quatro fármacos do estudo resultou em bilirrubinemia significativamente menor nas fêmeas do que aquela observada nos grupos de associações aos pares dos fármacos, de acordo com o Gráfico 59.

Gráfico 59 – Resultado da análise de bilirrubina total nos animais fêmeas. Comparação dos grupos de associações de fármacos (n=6 animais/grupo).

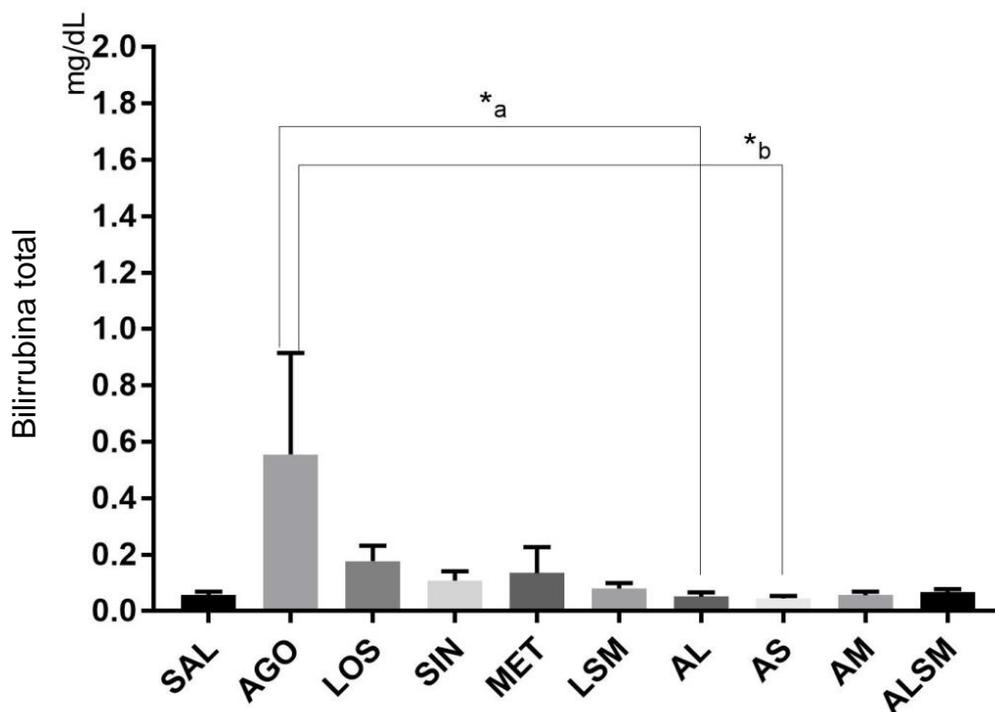


Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. Valores de p: **p=0,0034; ***p=0,0001; ****p<0,0001 – significantes, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média. Fonte: elaborado pelo autor.

5.2.3.2 Machos

Nos machos, o grupo da agomelatina usada em monoterapia apresentou taxa de bilirrubina total significativamente maior quando comparada com as suas associações com losartana e com sinvastatina (Gráfico 60).

Gráfico 60 – Resultado da análise de bilirrubina total nos animais machos. Comparação dos grupos de associações de fármacos (n=6 animais/grupo).



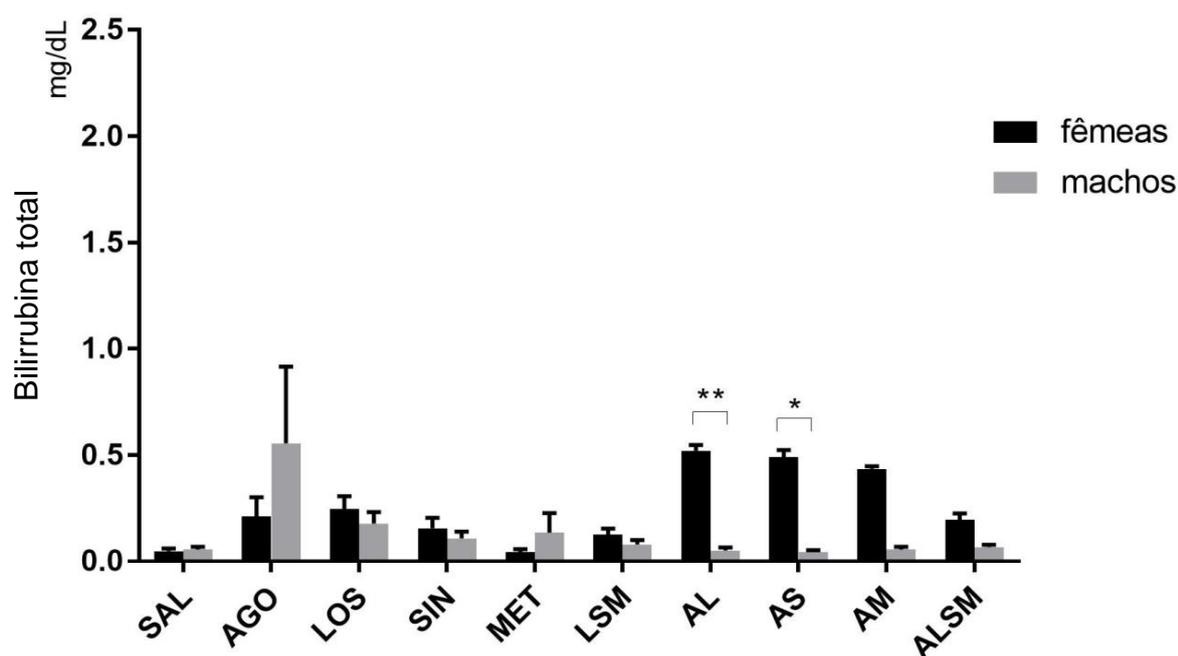
Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. Valores de p - *a: p=0,0461; *b: p=0,0411 – significantes, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: elaborado pelo autor.

5.2.3.3 Comparação entre sexos

As fêmeas dos grupos em que a agomelatina foi associada aos pares com losartana e com sinvastatina apresentaram taxa de bilirrubina total superior aos machos em uso das mesmas combinações de fármacos, conforme demonstrado no Gráfico 61.

Gráfico 61 – Resultado da análise da bilirrubina total em fêmeas e machos. Comparação entre sexos (n=6 animais/grupo).



Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. Valores de p - *p=0,0121; **p=0,0058 – significantes, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: elaborado pelo autor.

5.2.4 Bilirrubina direta

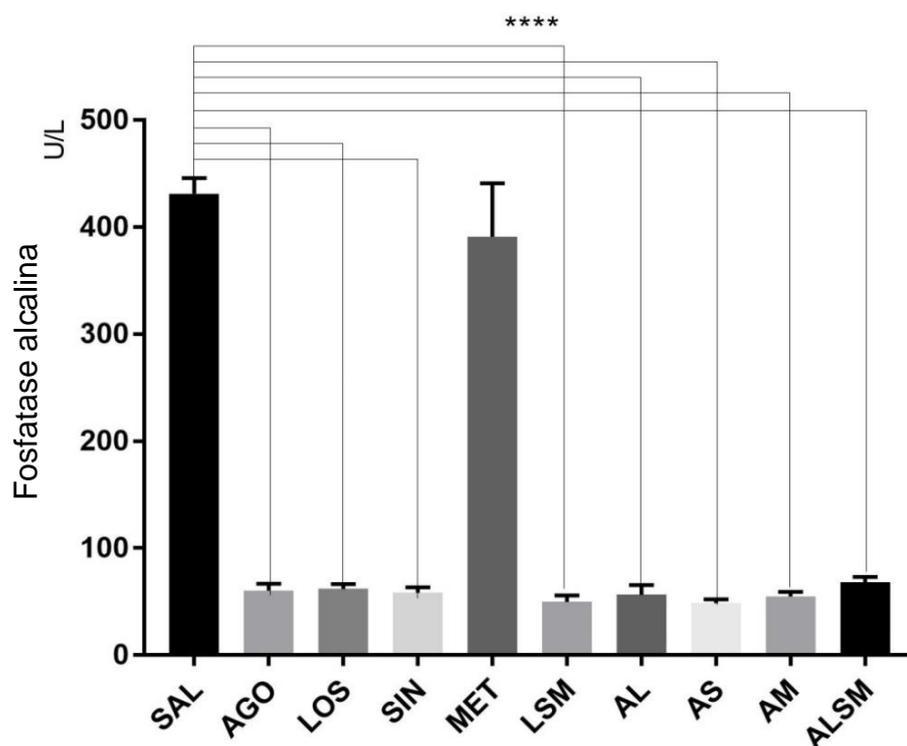
As taxas de bilirrubina direta não apresentaram diferenças significativas nos grupos de tratamento comparados entre si e nem na comparação entre sexos.

5.2.5 Fosfatase alcalina

5.2.5.1 Fêmeas

O parâmetro fosfatase alcalina sofreu redução significativa ($p < 0,0001$) em todos os grupos de tratamento dos animais fêmeas em relação ao controle salina, exceto no grupo metformina, conforme se observa no Gráfico 62. A fosfatase alcalina baixa está relacionada, dentre outros fatores, a condições de anemia severa; condição esta que está presente entre as fêmeas do estudo.

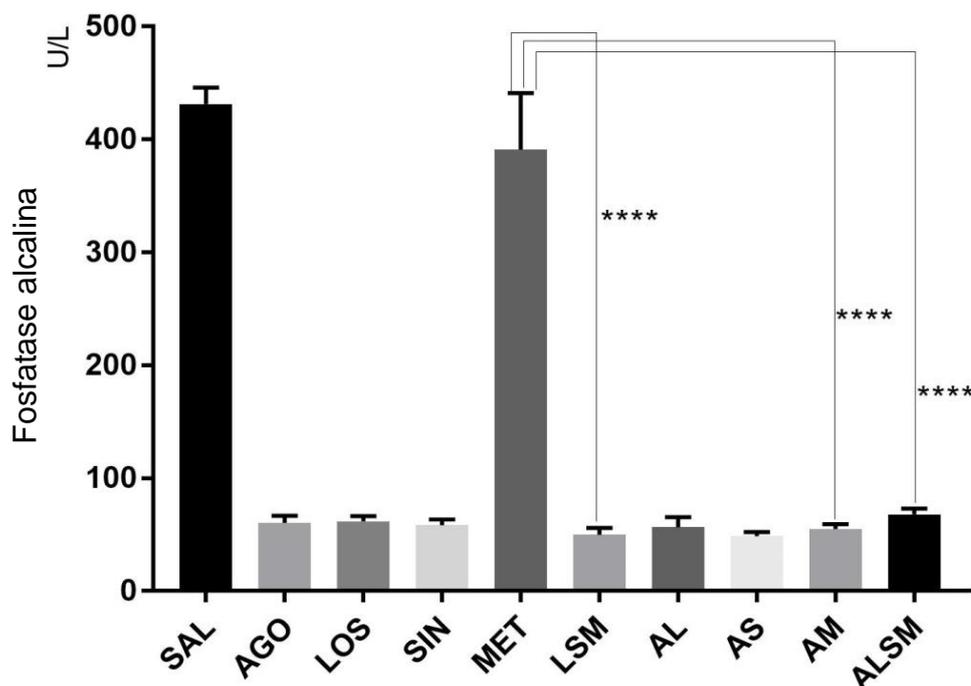
Gráfico 62 – Resultado da análise de fosfatase alcalina nos animais fêmeas. Comparação dos grupos de tratamento com o grupo controle salina (SAL) ($n=6$ animais/grupo).



Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. ****Todos as comparações com valores de $p < 0,0001$ – significantes, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média. Fonte: elaborado pelo autor.

A comparação entre a monoterapia e as associações com o respectivo fármaco revelou que ocorreu uma redução relevante nos níveis de fosfatase alcalina dos grupos em que a metformina foi utilizada em associação com um, dois ou três fármacos frente ao fármaco isolado (Gráfico 63).

Gráfico 63 – Resultado da análise da fosfatase alcalina total nos animais fêmeas. Comparação do grupo metformina em monoterapia (MET) com os grupos de associação da metformina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).



Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. ****Valor de $p < 0,0001$ – significativo, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: elaborado pelo autor.

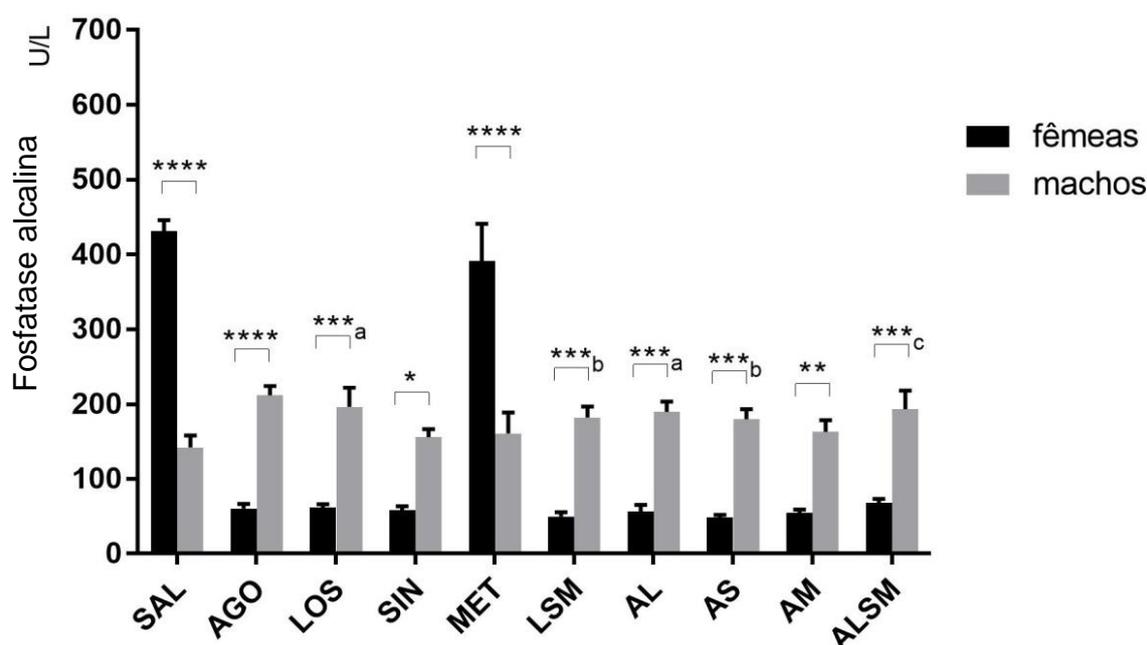
5.2.5.2 Machos

A fosfatase alcalina não foi afetada nos animais machos, não ocorrendo diferença significativa entre os grupos experimentais.

5.2.5.3 Comparação entre sexos

A análise da fosfatase alcalina entre sexos revelou que houve uma inversão nas taxas deste parâmetro nos machos e fêmeas em todos os grupos que receberam tratamento em relação ao grupo controle salina: todas as taxas de fosfatase alcalina nas fêmeas dos grupos em tratamento foram reduzidas em relação ao grupo controle, enquanto todas as taxas dos machos nestes mesmos grupos aumentaram em relação ao controle salina. Em todos os grupos, houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os sexos (Gráfico 64).

Gráfico 64 – Resultado da análise da fosfatase alcalina em fêmeas e machos. Comparação entre sexos (n=6 animais/grupo).



Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. Valores de p - * $p=0,0250$; ** $p=0,0060$; ***a: $p=0,0001$; ***b: $p=0,0002$; ***c: $p=0,0005$; **** $p < 0,0001$ – significantes, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: elaborado pelo autor.

5.2.6 Gama glutamil transpeptidase (gama GT)

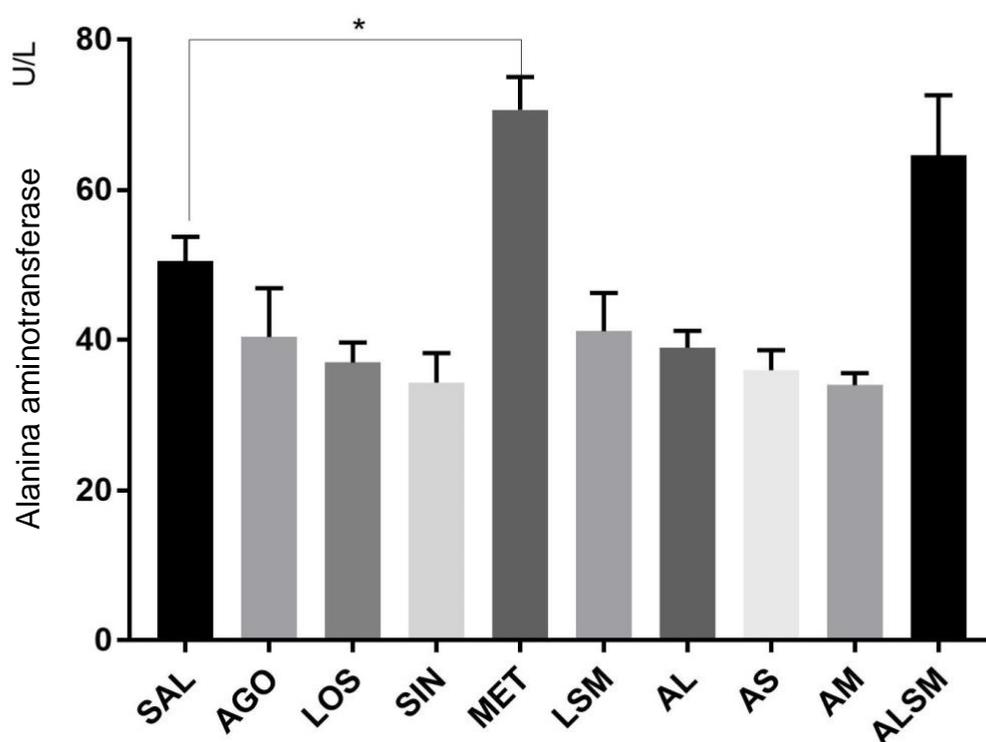
Não houve alteração no parâmetro gama glutamil transpeptidase ao serem comparados os grupos entre si e nem na comparação entre os sexos.

5.2.7 Alanina aminotransferase (ALT)

5.2.7.1 Fêmeas

A taxa de alanina aminotransferase no grupo de fêmeas tratadas com metformina foi significativamente maior do que a taxa verificada no grupo controle em uso de salina (Gráfico 65).

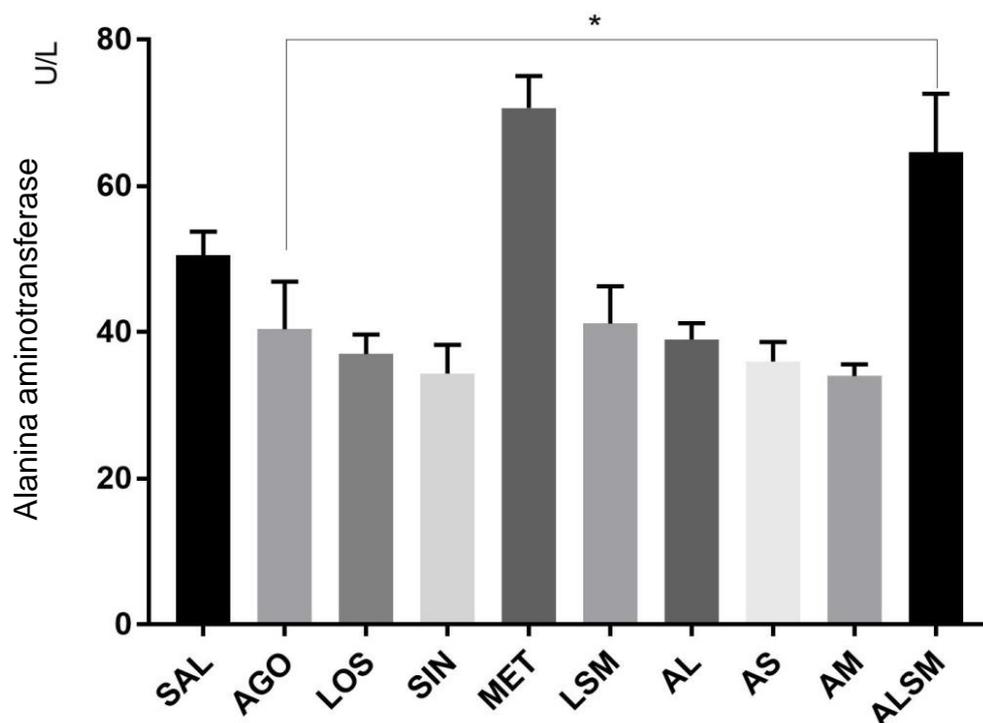
Gráfico 65 – Resultado da análise de alanina aminotransferase nos animais fêmeas. Comparação dos grupos de tratamento com o grupo controle salina (SAL) (n=6 animais/grupo).



Legenda: ALT: alanina aminotransferase; SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. *Valor de $p=0,0358$ – significativo, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média. Fonte: elaborado pelo autor.

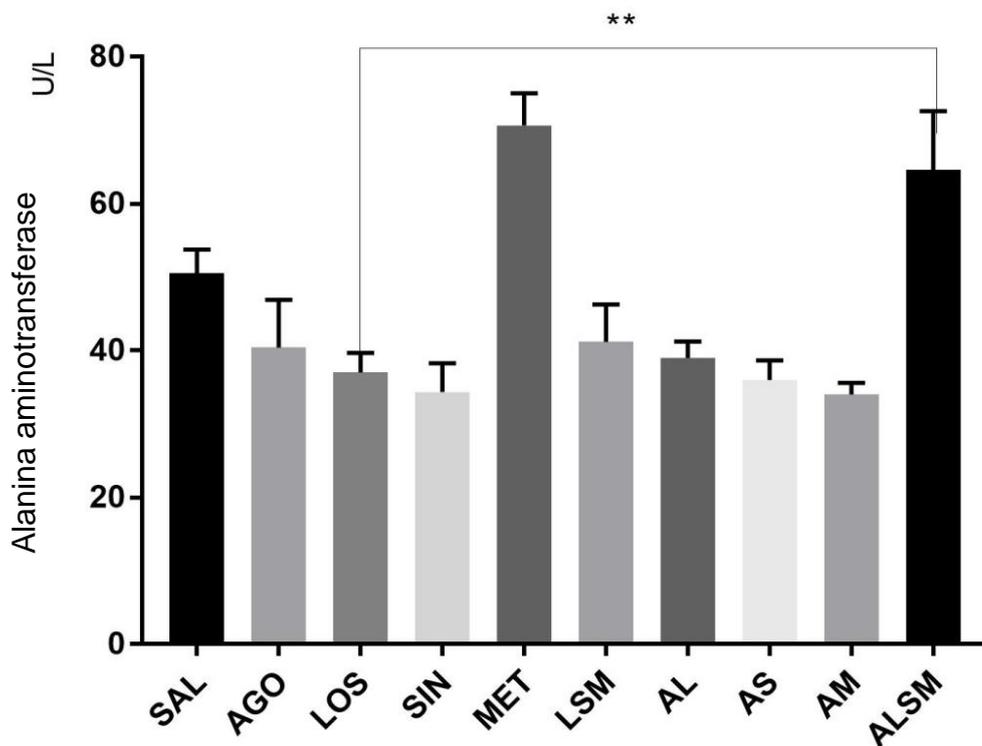
O grupo de fêmeas em uso da associação dos quatro fármacos apresentou elevação significativa da taxa de ALT em relação aos grupos em uso de cada fármaco isoladamente (exceto metformina), bem como em relação aos fármacos em associações duplas ou tripla, conforme observado nos Gráficos 66 a 68, refletindo possível sobrecarga hepática com o uso de polifarmácia.

Gráfico 66 – Resultado da análise da alanina aminotransferase nos animais fêmeas. Comparação do grupo agomelatina em monoterapia (AGO) com os grupos de associação da agomelatina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).



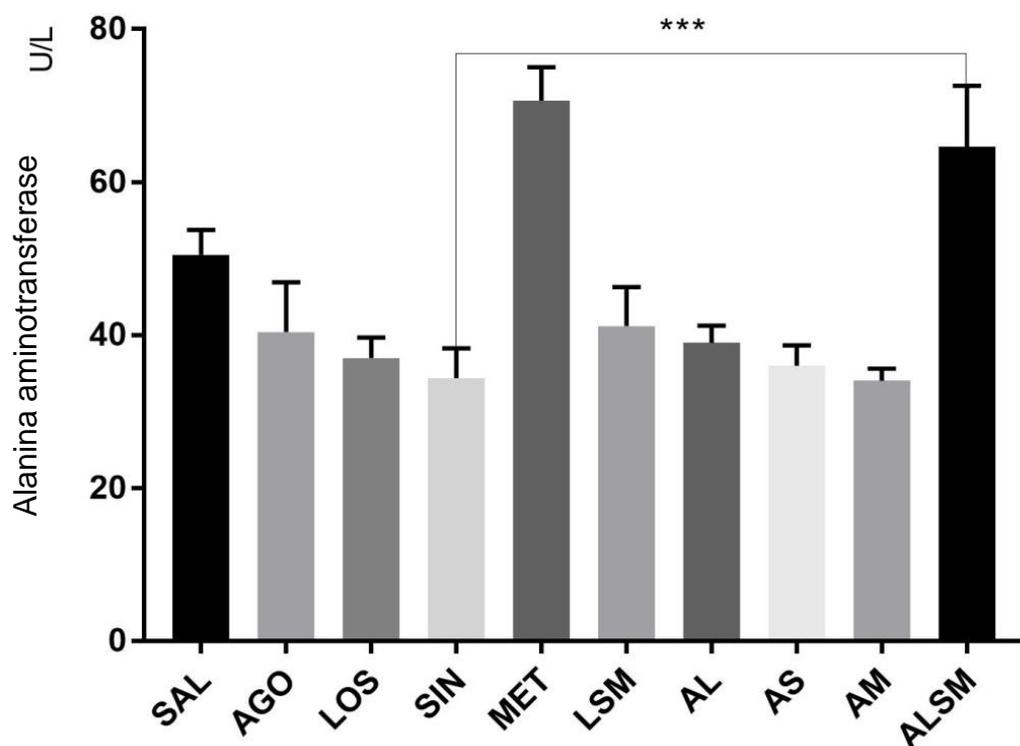
Legenda: ALT: alanina aminotransferase; SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. *Valor de $p=0,0145$ – significativo, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média. Fonte: elaborado pelo autor.

Gráfico 67 – Resultado da análise da alanina aminotransferase nos animais fêmeas. Comparação do grupo losartana em monoterapia (LOS) com os grupos de associação da losartana com outros fármacos (n=6 animais/grupo).



Legenda: ALT: alanina aminotransferase; SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. **Valor de $p=0,0016$ – significativo, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média. Fonte: elaborado pelo autor.

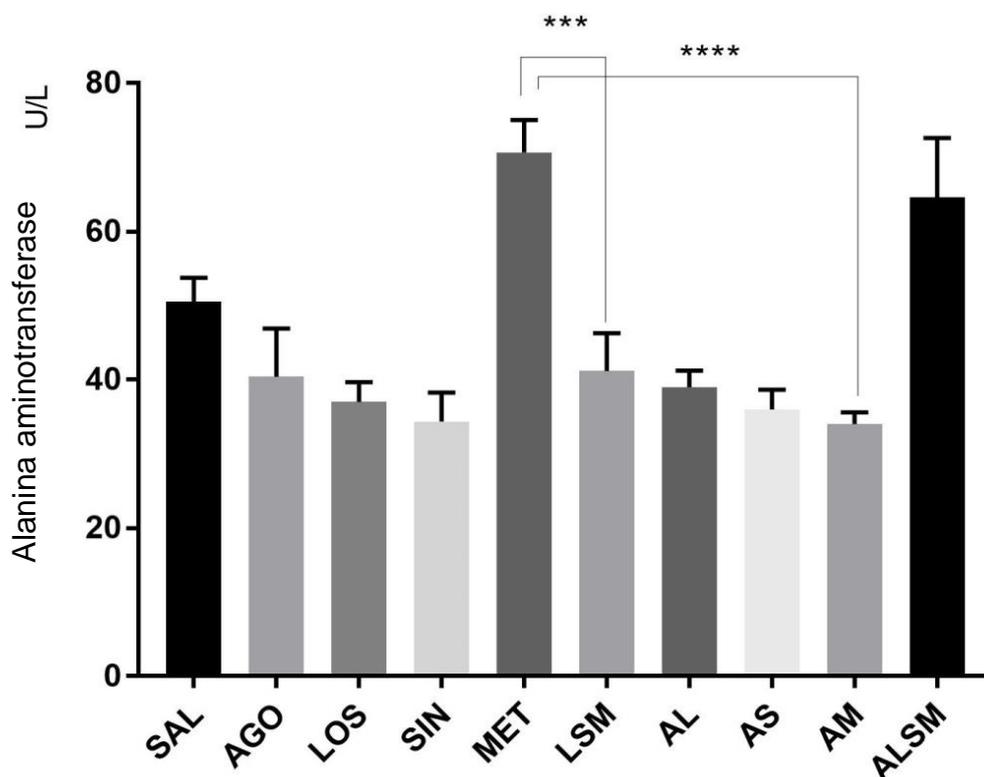
Gráfico 68 – Resultado da análise da alanina aminotransferase nos animais fêmeas. Comparação do grupo sinvastatina em monoterapia (SIN) com os grupos de associação da sinvastatina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).



Legenda: ALT: alanina aminotransferase; SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. *Valor de $p=0,0145$ – significativo, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média. Fonte: elaborado pelo autor.

A comparação entre grupos revelou que a metformina utilizada isoladamente impactou na maior taxa de ALT entre as fêmeas em comparação com o mesmo fármaco associado em par com a agomelatina ou em terapia tripla juntamente com losartana e sinvastatina (Gráfico 69).

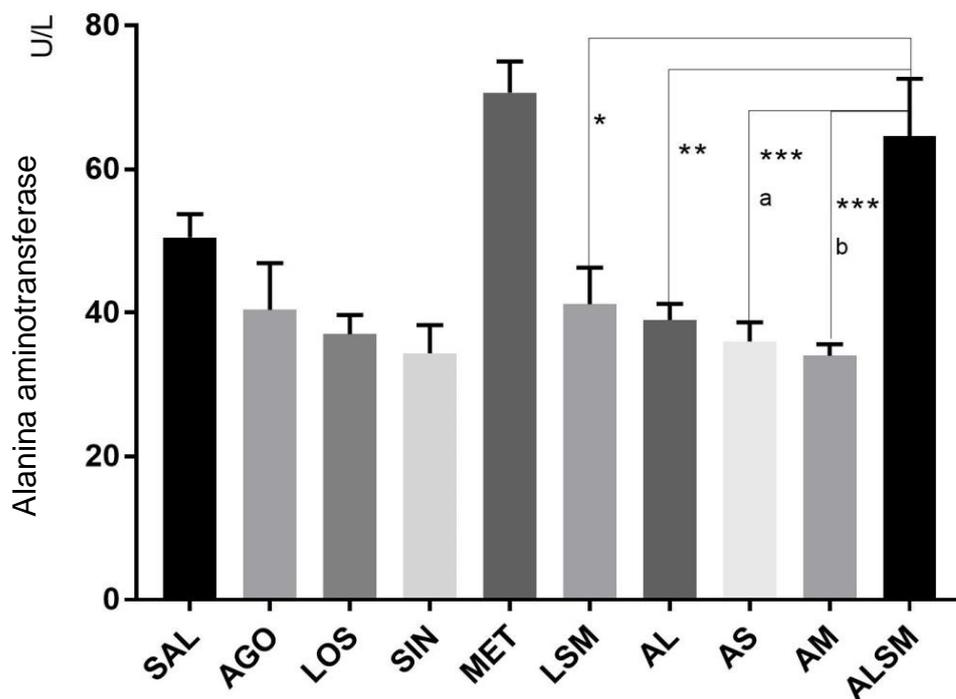
Gráfico 69 – Resultado da análise da alanina aminotransferase nos animais fêmeas. Comparação do grupo metformina em monoterapia (MET) com os grupos de associação da metformina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).



Legenda: ALT: alanina aminotransferase; SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. Valores de p - ***p=0,0003; ****p<0,0001 – significantes, de acordo com o teste de Tukey.

Fonte: elaborado pelo autor

Gráfico 70 – Resultado da análise de alanina aminotransferase nos animais fêmeas. Comparação dos grupos de associações de fármacos (n=6 animais/grupo).



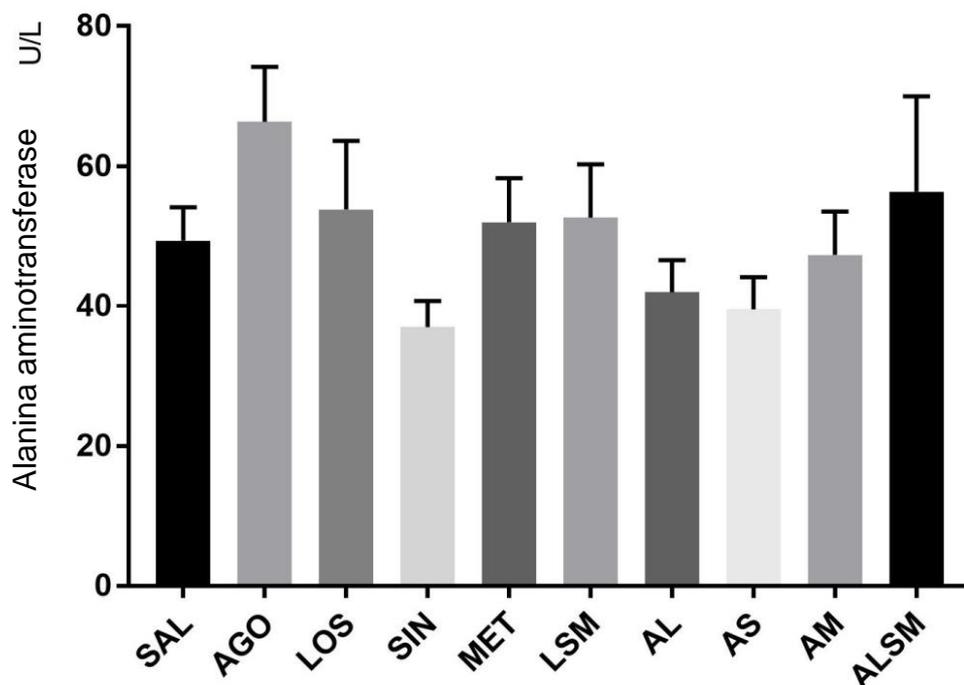
Legenda: ALT: alanina aminotransferase; SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. Valores de p: *p=0,0128; **p=0,0045; ***a: p=0,0010; ***b: p=0,0003 – significantes, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: elaborado pelo autor.

5.2.7.2 Machos

Os machos não sofreram impacto do uso dos fármacos isolados ou em associações sobre as taxas de alanina aminotransferase, conforme demonstra o Gráfico 71.

Gráfico 71 – Resultado da análise da alanina aminotransferase nos animais machos. Comparação dos grupos entre si (n=6 animais/grupo).



Legenda: ALT: alanina aminotransferase; SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. Sem valores de p significantes, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: elaborado pelo autor.

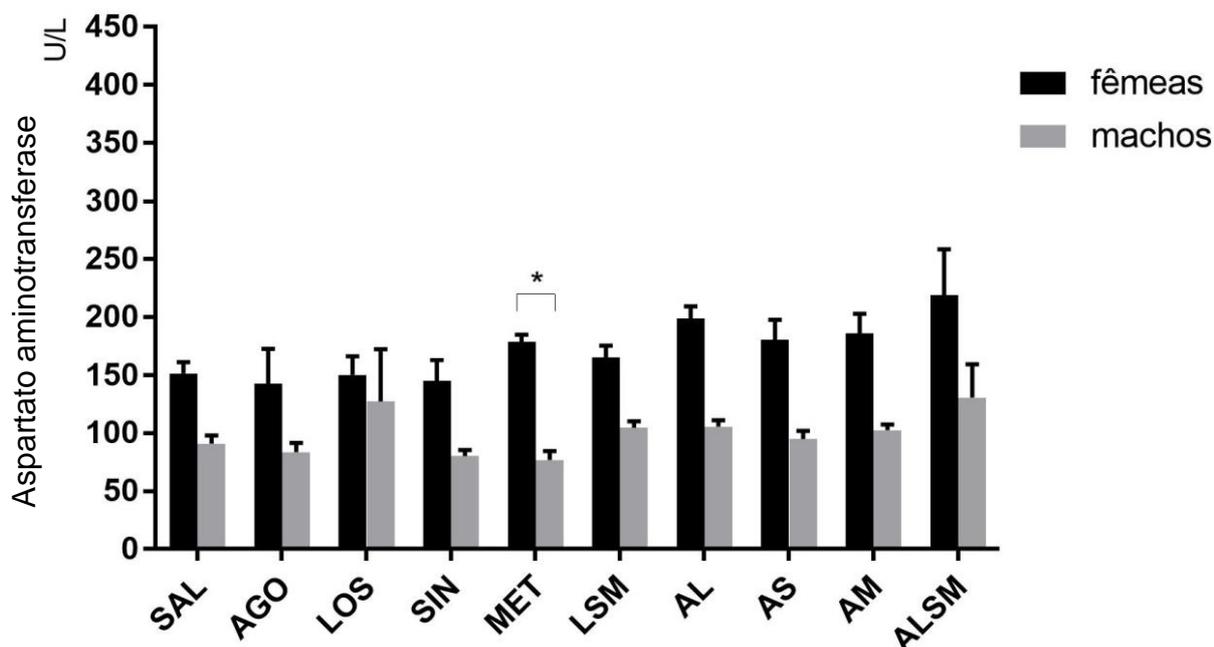
5.2.7.3 Comparação entre sexos

A taxa de ALT não apresentou diferença significativa entre fêmeas e machos em nenhum dos grupos experimentais, seguindo a tendência dos animais não tratados (controle salina).

5.2.8 Aspartato aminotransferase (AST)

O parâmetro AST não apresentou diferenças entre os grupos experimentais de fêmeas e nem de machos. Na comparação entre sexos, apenas o grupo metformina revelou diferença, com a taxa de AST significativamente maior em fêmeas do que em machos (Gráfico 72).

Gráfico 72 – Resultado da análise da aspartato aminotransferase em fêmeas e machos. Comparação entre sexos (n=6 animais/grupo).



Legenda: AST: aspartato aminotransferase; SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. *Valor de $p=0,0202$, significativo, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

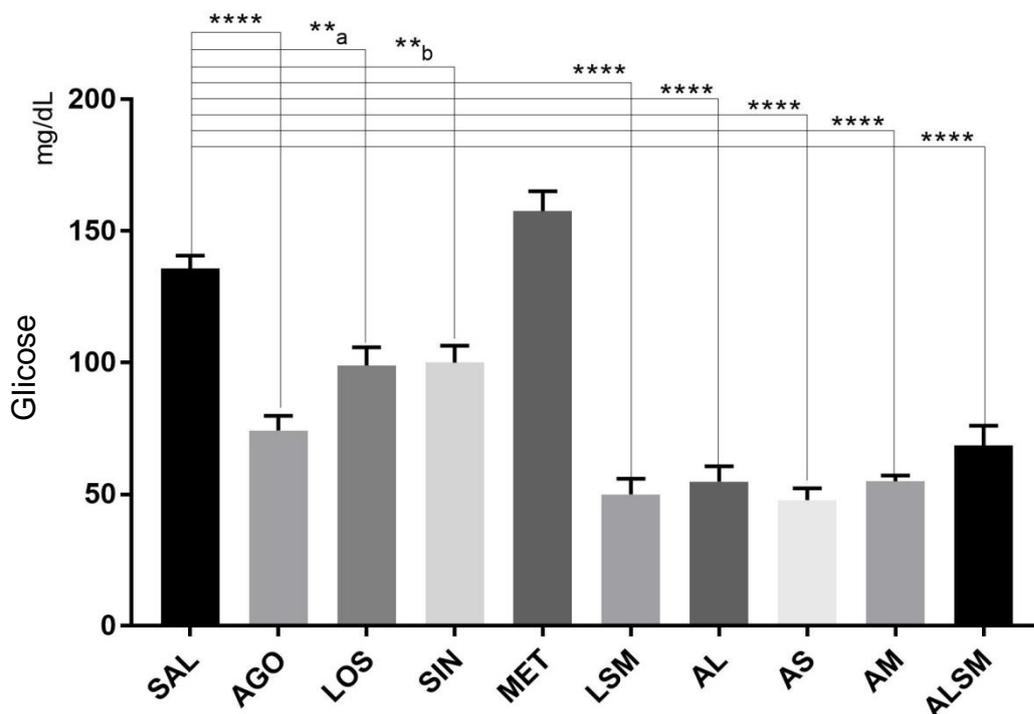
Fonte: elaborado pelo autor.

5.2.9 Glicose

5.2.9.1 Fêmeas

A glicemia de todos os grupos experimentais de fêmeas (exceto o grupo em uso de metformina) foi inferior àquela do grupo controle salina (Gráfico 73).

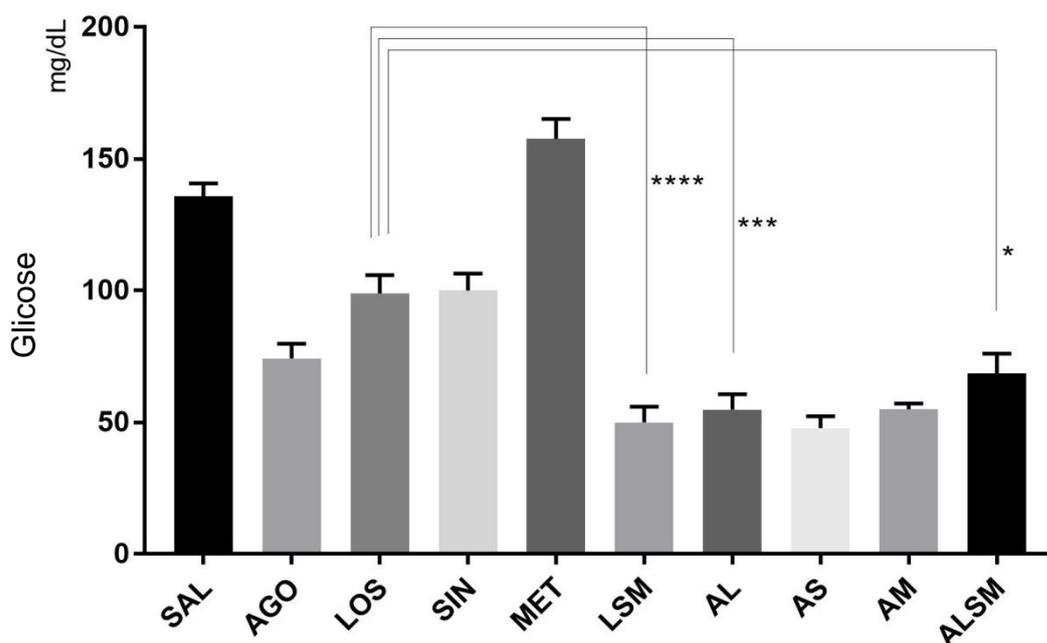
Gráfico 73 – Resultado da análise da glicose nos animais fêmeas. Comparação dos grupos de tratamento com o grupo controle salina (SAL) (n=6 animais/grupo).



Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. Valores de p - **a: p=0,0023; **b: p=0,0033; ****p<0,0001 – significantes, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média. Fonte: elaborado pelo autor.

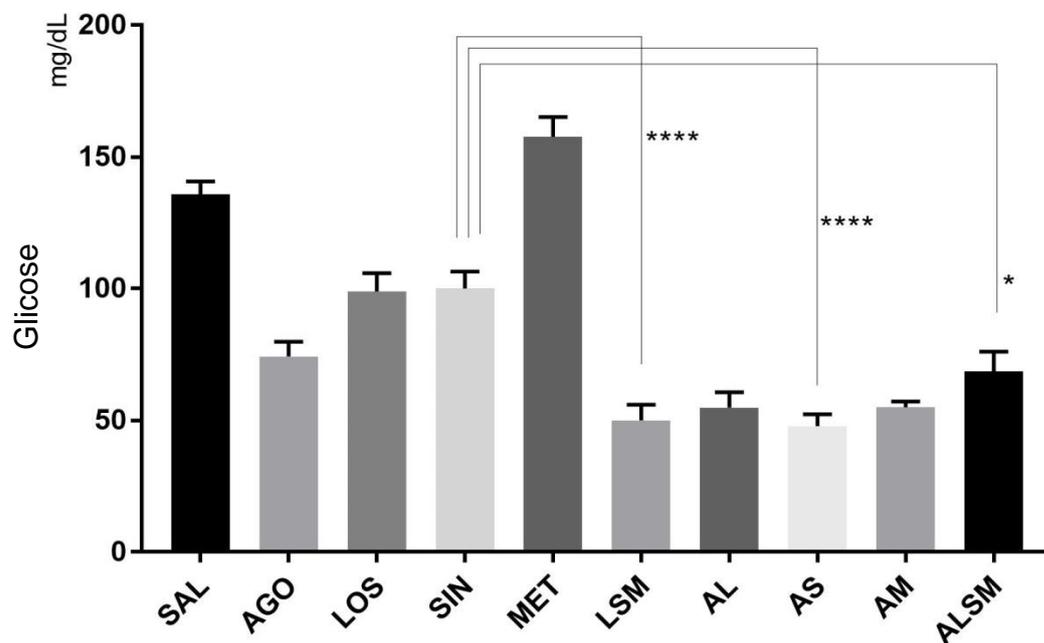
As fêmeas em uso de losartana em combinação com outros fármacos apresentaram glicemia significativamente menor do que aquelas em uso de losartana em monoterapia, o mesmo sendo observado com sinvastatina e metformina e suas combinações a comparadas com os grupos que usaram os fármacos isoladamente (Gráficos 74 a 76).

Gráfico 74 – Resultado da análise de glicose nos animais fêmeas. Comparação do grupo losartana em monoterapia (LOS) com grupos de associações da losartana com outros fármacos (n=6 animais/grupo).



Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. Valores de p - *p=0,0206; ***p=0,0001; ****p<0,0001 – significantes, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média. Fonte: elaborado pelo autor.

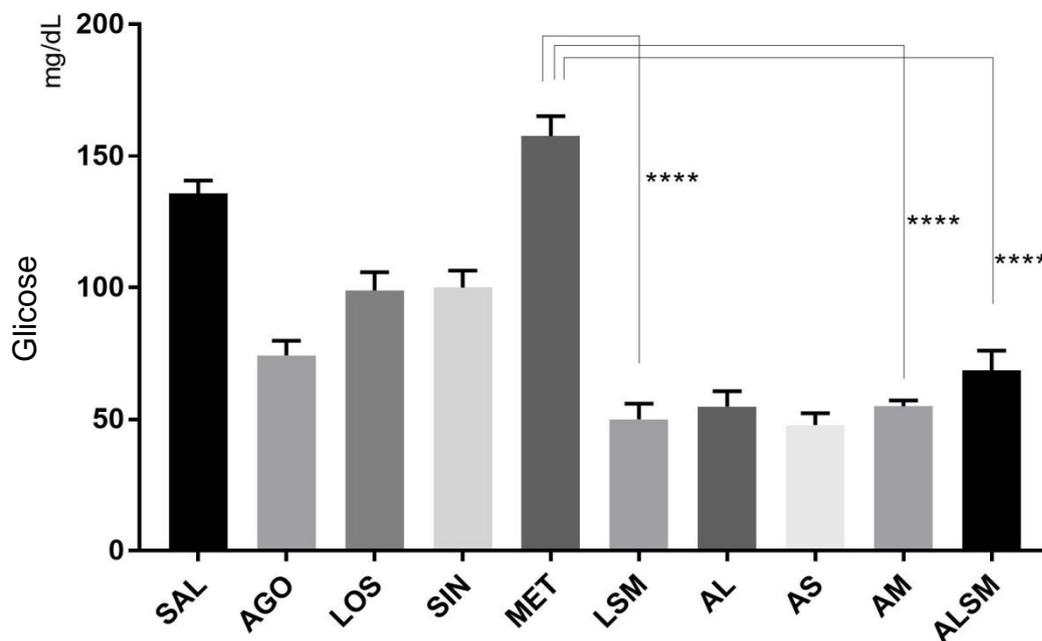
Gráfico 75 – Resultado da análise de glicose nos animais fêmeas. Comparação do grupo sinvastatina em monoterapia (SIN) com grupos de associações da sinvastatina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).



Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. Valores de p - *p=0,0147; ****p<0,0001 – significantes, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: elaborado pelo autor.

Gráfico 76 – Resultado da análise de glicose nos animais fêmeas. Comparação do grupo metformina em monoterapia (MET) com grupos de associações da metformina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).



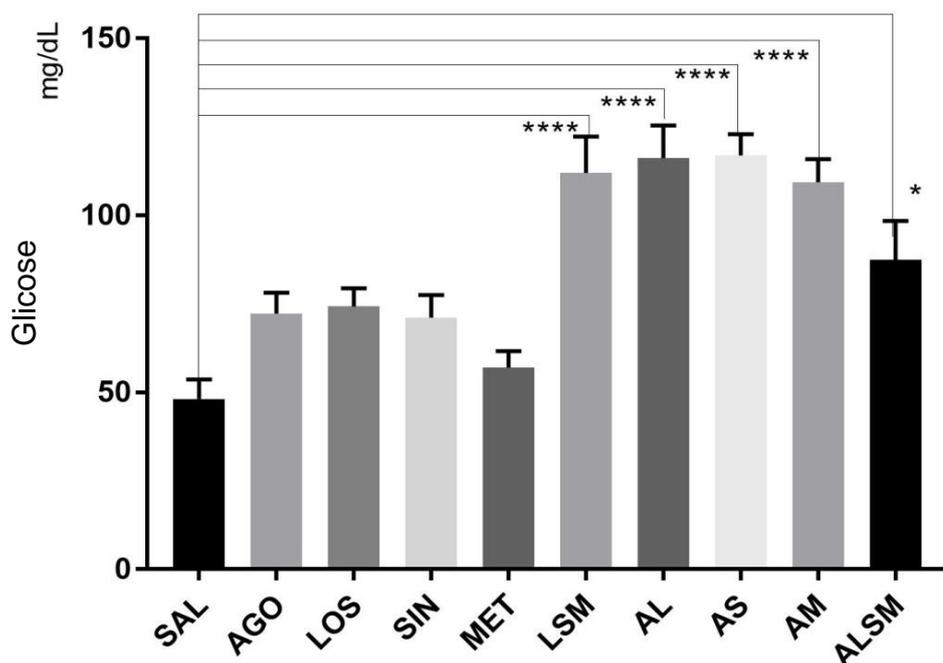
Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. ****Valores de $p < 0,0001$ – significantes, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: elaborado pelo autor.

5.2.9.2 Machos

A glicemia nos machos sofreu alterações em relação ao grupo controle, estando aumentada significativamente entre os animais de todos os grupos que fizeram uso de algum tipo de associação de fármacos, conforme ilustra o Gráfico 77.

Gráfico 77 – Resultado da análise da glicose nos animais machos. Comparação dos grupos de tratamento com o grupo controle salina (SAL) (n=6 animais/grupo).

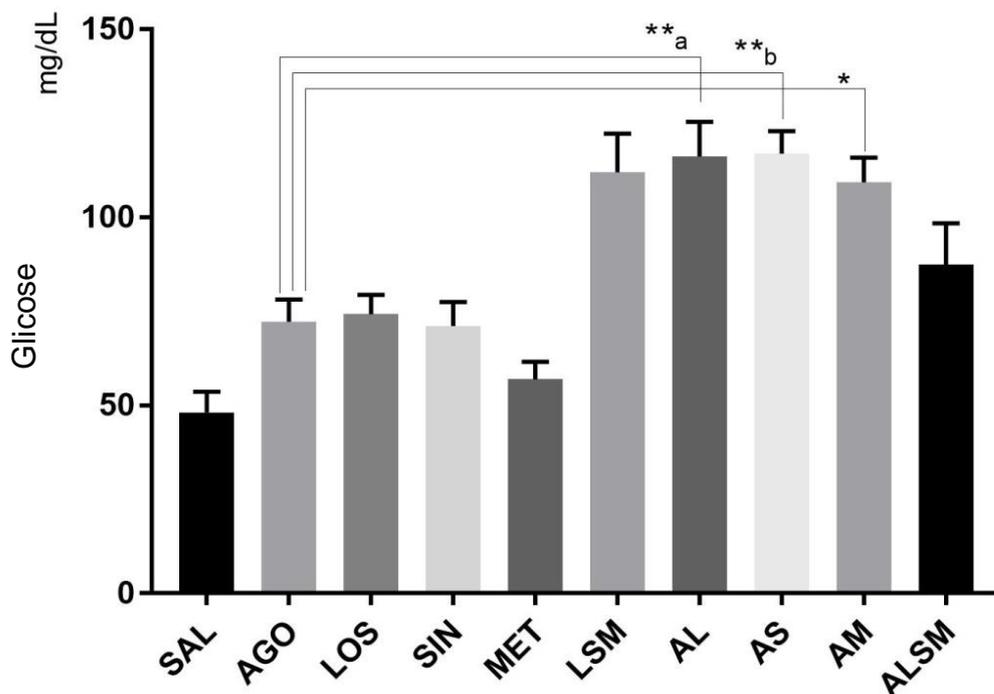


Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. Valores de p - *p=0,0142; ****p<0,0001 – significantes, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: elaborado pelo autor.

A agomelatina associada aos pares com losartana, sinvastatina ou metformina culminou em elevação da glicose em relação ao grupo em uso isolado de agomelatina nos animais machos (Gráfico 78).

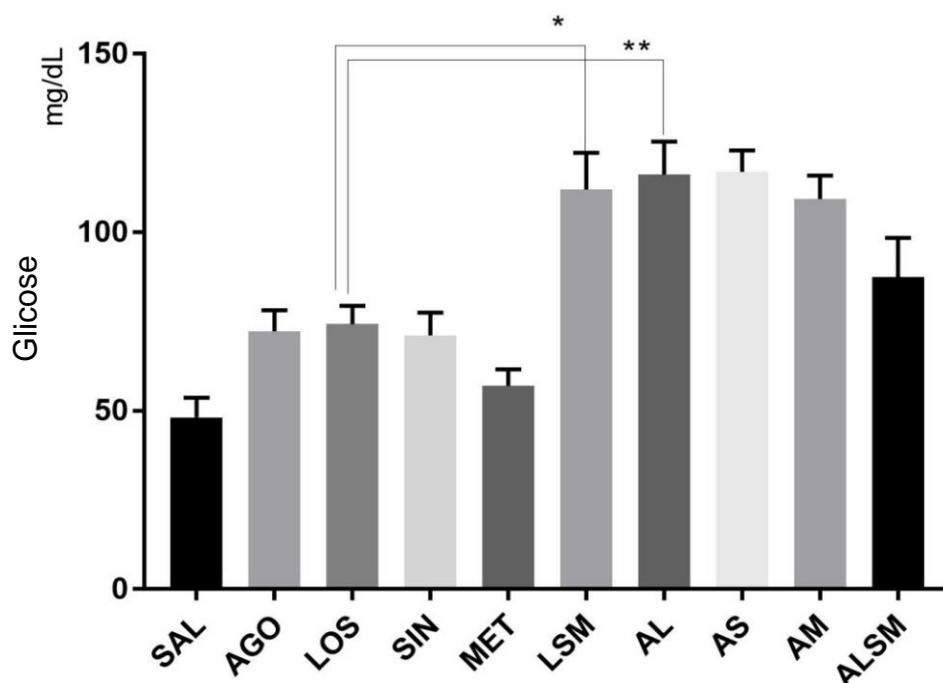
Gráfico 78 – Resultado da análise de glicose nos animais machos. Comparação do grupo agomelatina em monoterapia (AGO) com grupos de associações da agomelatina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).



Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. Valores de p - *p=0,0266; **a: p=0,0039; **b: p=0,0031 – significantes, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média. Fonte: elaborado pelo autor.

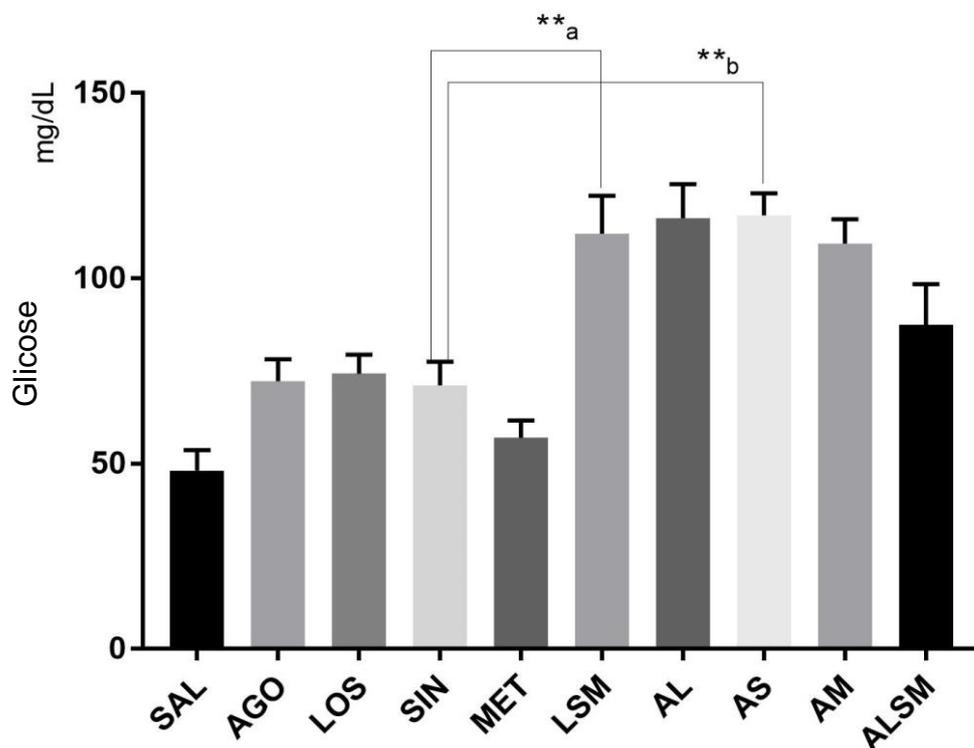
Também em relação à losartana, quando esta foi associada com agomelatina ou com sinvastatina e metformina, culminou em elevação da glicose em relação ao grupo em uso isolado de losartana nos animais machos (Gráfico 79). A elevação da glicemia nos machos nos grupos de associações de fármacos também ocorreu com a sinvastatina e a metformina, de modo semelhante ao verificado com a losartana, em que os grupos combinados apresentaram taxa de glicose superior àquela dos grupos em uso dos respectivos fármacos em monoterapia, conforme demonstrado nos Gráficos 80 e 81.

Gráfico 79 – Resultado da análise de glicose nos animais machos. Comparação do grupo losartana em monoterapia (LOS) com grupos de associações da losartana com outros fármacos (n=6 animais/grupo).



Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. Valores de p - *a: p=0,0223; *b: p=0,0443; **p=0,0070 – significantes, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média. Fonte: elaborado pelo autor.

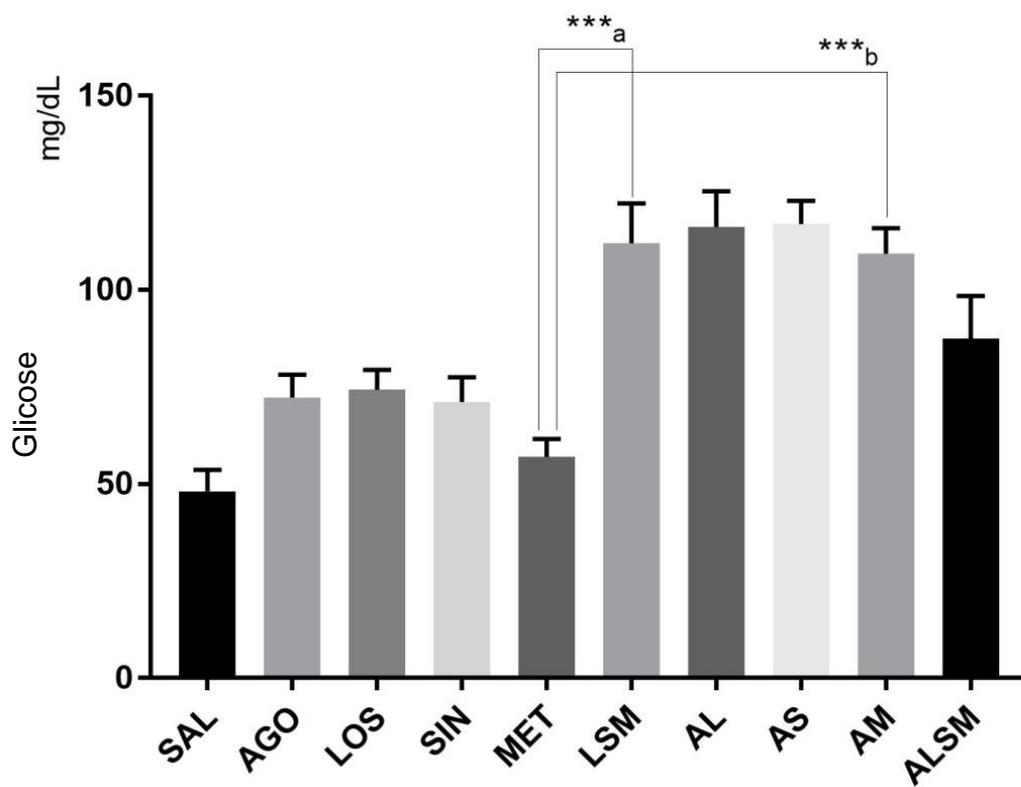
Gráfico 80 – Resultado da análise de glicose nos animais machos. Comparação do grupo sinvastatina em monoterapia (SIN) com grupos de associações da sinvastatina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).



Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. Valores de p - ****a**: p=0,0094; ****b**: p=0,0022 – significantes, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: elaborado pelo autor.

Gráfico 81 – Resultado da análise de glicose nos animais machos. Comparação do grupo metformina em monoterapia (MET) com grupos de associações da metformina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).



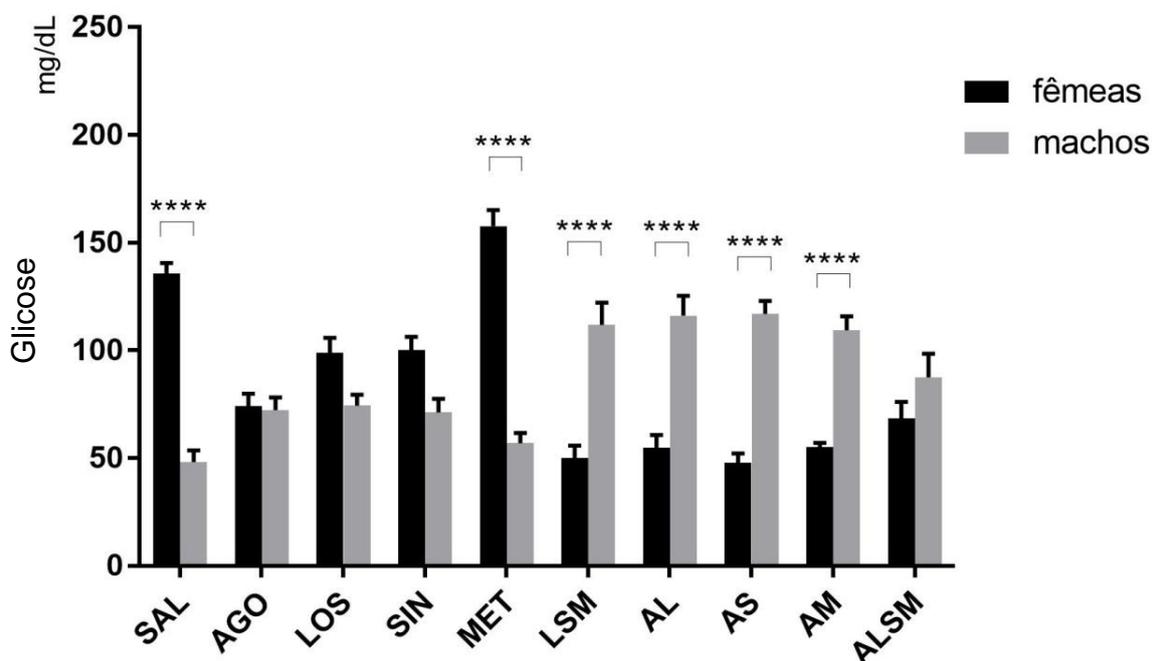
Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. Valores de p - ***a: p=0,0001; **b: p=0,0003 – significantes, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: elaborado pelo autor.

5.2.9.3 Comparação entre sexos

Observou-se uma inversão entre as taxas de glicose de machos e fêmeas nos grupos de associações de dois ou três fármacos: no controle, bem como nos fármacos usados em monoterapia, a taxa de glicose das fêmeas mostrou-se maior que a dos machos; com a associação de drogas, todas as glicemias dos machos foram superiores às das fêmeas com diferença significativa entre os sexos ($p < 0,0001$) nos grupos de fármacos combinados (Gráfico 82).

Gráfico 82 – Resultado da análise da glicose em fêmeas e machos. Comparação entre sexos (n=6 animais/grupo).



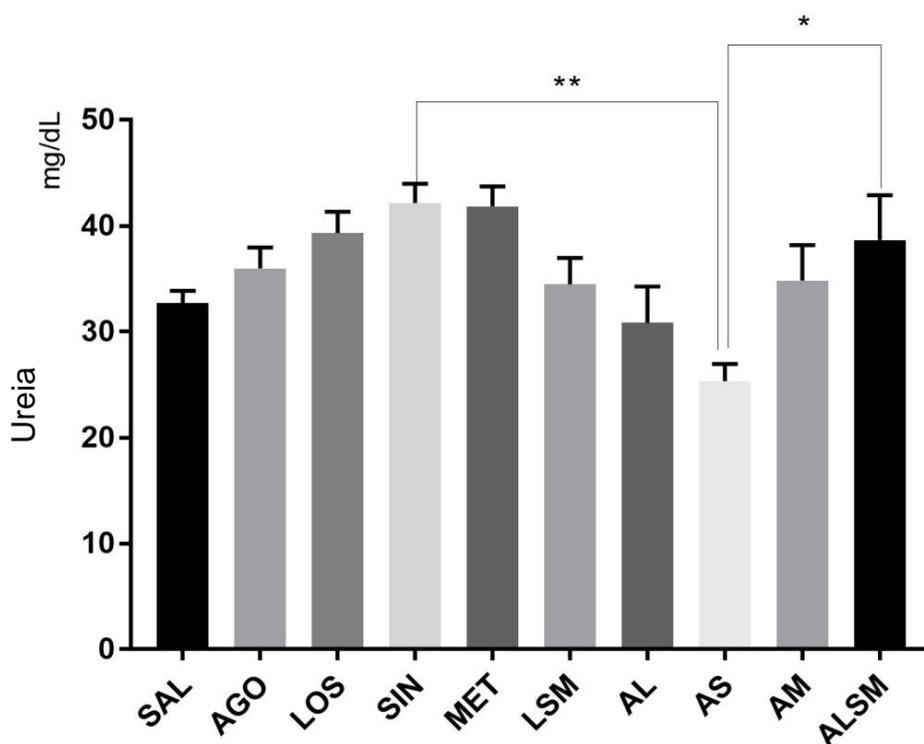
Legenda: AST: aspartato aminotransferase; SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. ****Valores de $p < 0,0001$, significantes, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média. Fonte: elaborado pelo autor.

5.2.10 Ureia

5.2.10.1 Fêmeas

A taxa de ureia nas fêmeas sofreu alteração na comparação entre o grupo em uso de sinvastatina isoladamente e desta associada à agomelatina, sendo maior no grupo em monoterapia. A comparação entre a associação dupla de sinvastatina e agomelatina com o grupo em uso dos quatro fármacos, demonstrou que houve elevação significativa da taxa de ureia no grupo em polifarmácia, conforme observado no Gráfico 83.

Gráfico 83 – Resultado da análise de ureia nos animais fêmeas. Comparação dos grupos de associações de fármacos (n=6 animais/grupo).



Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. Valores de p - *p=0,0192; **p=0,0010 – significantes, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: elaborado pelo autor.

5.2.10.2 Machos e comparação entre sexos

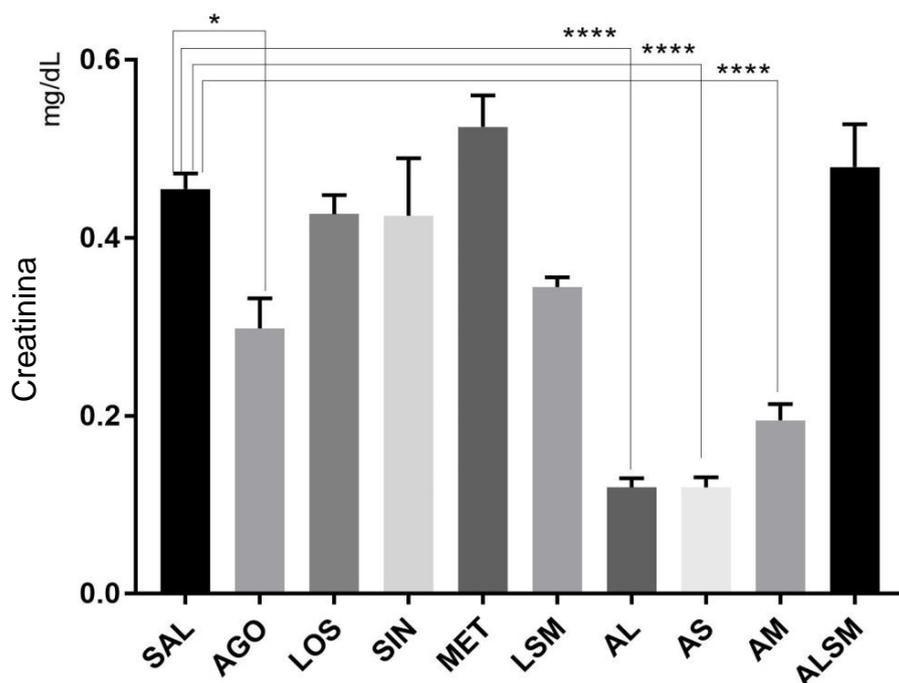
Os machos não sofreram impacto na taxa de ureia na comparação entre os grupos experimentais, bem como não ocorreu diferença entre os sexos.

5.2.11 Creatinina

5.2.11.1 Fêmeas

As fêmeas apresentaram redução significativa na taxa de creatinina em relação ao grupo controle nos grupos em uso de agomelatina em monoterapia, bem como nos grupos em que a agomelatina foi utilizada em associação com losartana, sinvastatina ou metformina (Gráfico 84).

Gráfico 84 – Resultado da análise de creatinina nos animais fêmeas. Comparação dos grupos de tratamento com o grupo controle salina (SAL) (n=6 animais/grupo).

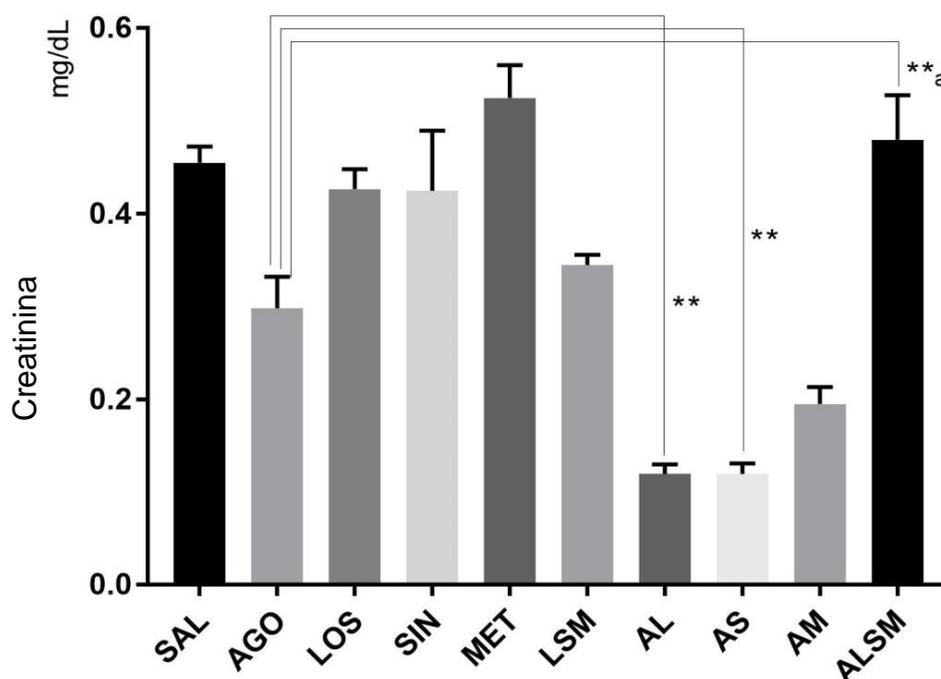


Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. Valores de p - *p=0,0345; ****p<0,0001 – significantes, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: elaborado pelo autor.

O perfil de creatinina das fêmeas demonstrou-se alterado quando se comparou o uso da agomelatina isoladamente com suas associações, sendo menor nos grupos em que a agomelatina foi usada aos pares com losartana ou sinvastatina e maior quando a agomelatina foi utilizada em associação conjunta com os outros três fármacos do estudo, conforme mostra o Gráfico 85.

Gráfico 85 – Resultado da análise da creatinina nos animais fêmeas. Comparação do grupo agomelatina em monoterapia (AGO) com grupos de associações da agomelatina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).

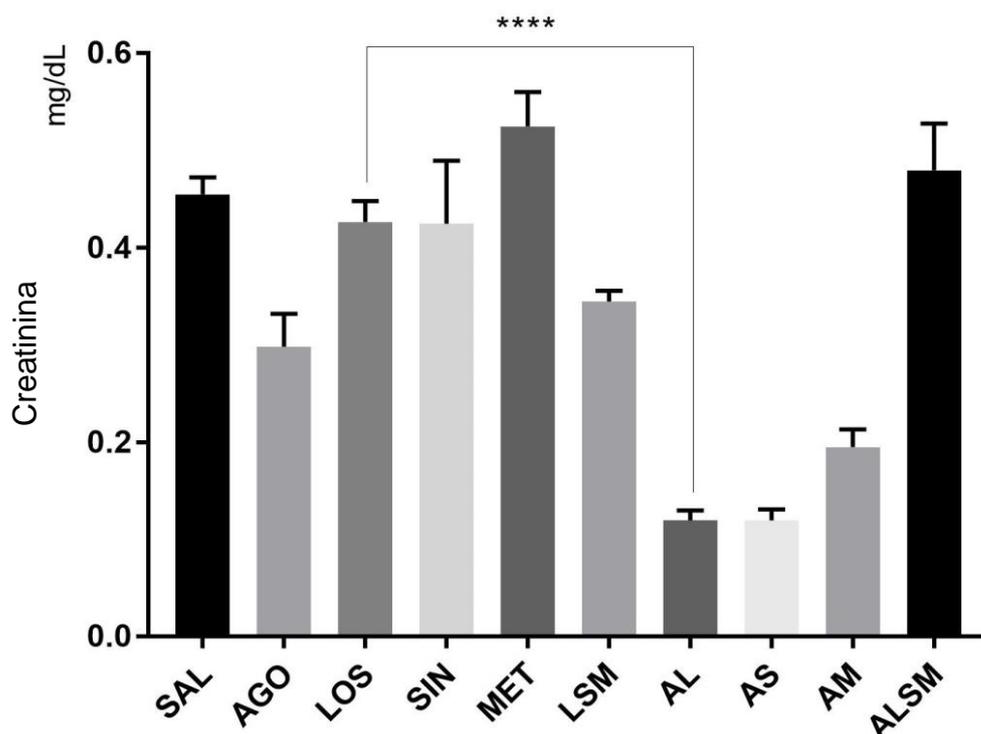


Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. Valores de p - **p=0,0090; **a: p=0,0072 – significantes, de acordo com o teste de Tukey.

Fonte: elaborado pelo autor

A losartana usada em monoterapia pelas fêmeas resultou em taxa de creatinina superior àquela observada no grupo em que este fármaco foi combinado com agomelatina, ou seja, a associação com agomelatina reduziu a creatinina em relação ao uso isolado da losartana (Gráfico 86).

Gráfico 86 – Resultado da análise da creatinina nos animais fêmeas. Comparação do grupo losartana em monoterapia (LOS) com grupos de associações da agomelatina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).

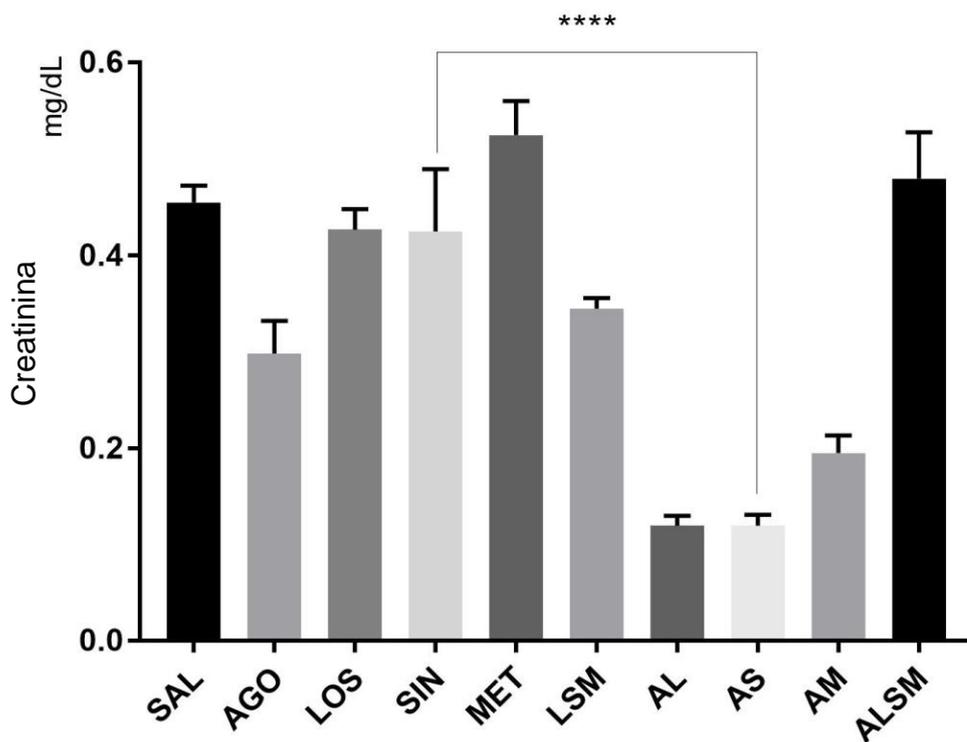


Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. ****Valor de $p < 0,0001$ – significativo, de acordo com o teste de Tukey.

Fonte: elaborado pelo autor

Também o uso da sinvastatina e da metformina isoladamente pelas fêmeas revelou taxas de creatininas superiores às observadas quando estes fármacos foram utilizados em associação com agomelatina (Gráficos 87 e 88), tal qual foi observado com a losartana (Gráfico 86).

Gráfico 87 – Resultado da análise da creatinina nos animais fêmeas. Comparação do grupo sinvastatina em monoterapia (SIN) com grupos de associações da sinvastatina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).

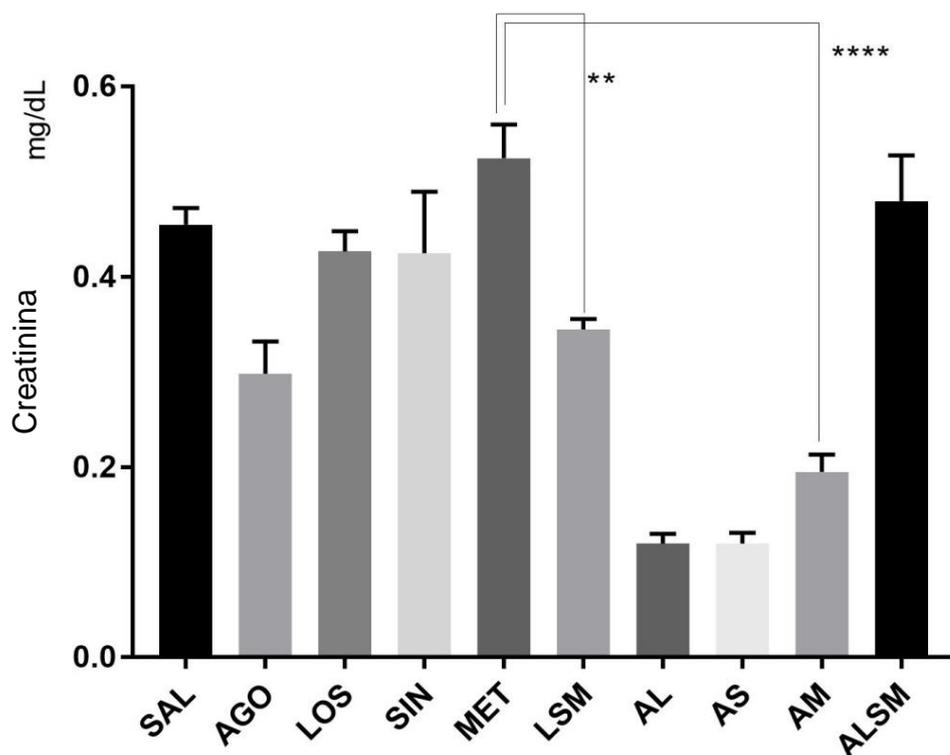


Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. ****Valor de $p < 0,0001$ – significativo, de acordo com o teste de Tukey.

Fonte: elaborado pelo autor

A metformina usada em monoterapia pelas fêmeas também resultou em menor taxa de creatinina quando utilizada em associação com losartana e sinvastatina, além de quando foi associada em par com a agomelatina, conforme citado anteriormente (Gráfico 84).

Gráfico 88 – Resultado da análise da creatinina nos animais fêmeas. Comparação do grupo metformina em monoterapia (MET) com grupos de associações da metformina com outros fármacos (n=6 animais/grupo).

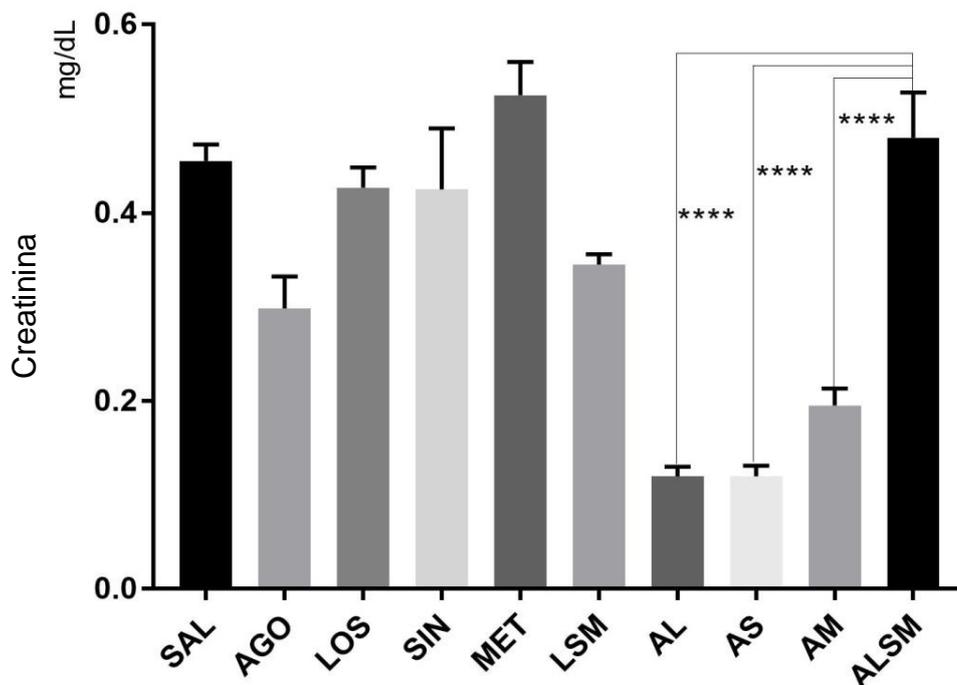


Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. Valores de p - **p=0,0080; ****p<0,0001 – significantes, de acordo com o teste de Tukey.

Fonte: elaborado pelo autor.

A associação de múltiplos fármacos aumentou significativamente os níveis de creatinina em relação aos fármacos utilizados aos pares. Conforme se observa no Gráfico 89.

Gráfico 89 – Resultado da análise da creatinina nos animais fêmeas. Comparação dos grupos de associações de fármacos (n=6 animais/grupo).



Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. ****Valores de $p < 0,0001$ – significantes, de acordo com o teste de Tukey.

Fonte: elaborado pelo autor

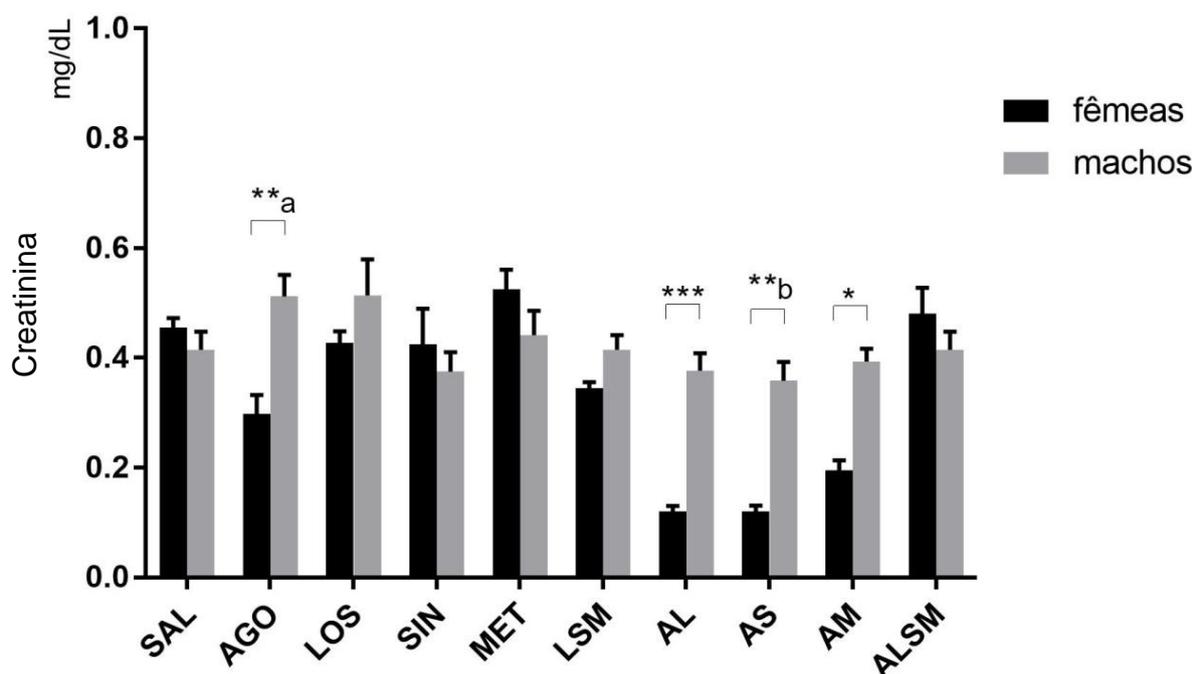
5.2.11.2 Machos

A taxa de creatinina não foi significativamente alterada entre os grupos experimentais de animais machos.

5.2.11.3 Comparação entre sexos

A comparação entre sexos revelou que as fêmeas dos grupos em uso da agomelatina em monoterapia, bem como em uso da agomelatina associada aos pares com losartana, sinvastatina ou metformina sofreram aumento significativo na taxa de creatinina em relação aos animais machos dos mesmos grupos (Gráfico 90).

Gráfico 90 – Resultado da análise de creatinina em fêmeas e machos. Comparação entre sexos (n=6 animais/grupo).



Legenda: AST: aspartato aminotransferase; SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. Valores de p - *p=0,0180; **a: p=0,0065; **b: p=0,0010; ***p=0,0002, significantes, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: elaborado pelo autor.

5.2.12 Tabela dos parâmetros bioquímicos comparados entre sexo

As médias \pm erro padrão da média dos parâmetros bioquímicos analisados comparados entre sexos estão demonstrados nas Tabelas 6 e 7, nas quais as comparações com diferença significativa entre fêmeas e machos, para mais ou para menos, encontram-se em negrito e sinalizadas com asterisco. Pelas tabelas, é possível verificar que a maioria dos parâmetros bioquímicos analisados (sete de onze) apresentou diferença significativa entre sexos em pelo menos um dos grupos de tratamento (sem considerar salina).

Tabela 6 – Média \pm erro padrão da média dos parâmetros bioquímicos analisados e comparação entre sexos – grupos em a (G1 a G5).

Parâmetro (unidade)	G1/SAL		G2/AGO		G3/LOS		G4/SIN		G5/MET	
	fêmeas n=6	machos n=6	fêmeas n=6	machos n=6	fêmeas n=6	machos n=6	fêmeas n=6	machos n=6	fêmeas n=6	machos n=6
Colesterol (mg/dL)	52,0 \pm 6,8	61,7 \pm 6,2	39,5\pm5,0*	77,3\pm7,0*	43,2 \pm 5,4	57,8 \pm 7,8	42,5 \pm 2,5	57,0 \pm 6,7	130,0\pm12,2*	66,3\pm6,8*
Triglicérides (mg/dL)	78,0 \pm 10,4	119,5 \pm 18,4	50,5\pm6,5*	110,7\pm10,2*	58,5 \pm 4,1	79,5 \pm 9,0	44,8 \pm 4,9	58,7 \pm 10,4	194,8\pm19,0*	94,0\pm7,9*
Glicose (mg/dL)	135,7\pm5,0*	48,2\pm5,5*	74,2 \pm 5,7	72,3 \pm 5,8	99,0 \pm 6,9	74,3 \pm 5,1	100,0 \pm 6,5	71,2 \pm 6,4	157,7\pm5,5*	57,0\pm4,7*
AST (U/L)	151,5 \pm 9,6	91,0 \pm 7,1	142,7 \pm 30,0	83,7 \pm 8,1	150,0 \pm 16,3	127,3 \pm 45,0	145 \pm 18,0	80,3 \pm 5,3	178,8 \pm 6,1	77,7 \pm 7,7
ALT (U/L)	50,5 \pm 3,2	49,3 \pm 4,8	40,4 \pm 6,5	66,3 \pm 7,8	37,0 \pm 2,7	53,8 \pm 9,8	34,3 \pm 4,0	37,0 \pm 3,7	70,7\pm4,4*	52,0\pm6,3*
Creatinina (mg/dL)	0,46 \pm 0,02	0,42 \pm 0,03	0,30\pm0,03*	0,51\pm0,04*	0,43 \pm 0,02	0,51 \pm 0,04	0,43 \pm 0,06	0,38 \pm 0,03	0,53 \pm 0,04	0,44 \pm 0,04
Ureia (mg/dL)	32,7 \pm 1,2	31,7 \pm 1,8	36,0 \pm 2,0	41,7 \pm 1,7	39,3 \pm 2,0	38,17 \pm 2,0	42,2 \pm 1,8	33,5 \pm 3,8	41,8 \pm 1,9	35,5 \pm 2,6
Gama GT (U/L)	2,5 \pm 0,3	3,5 \pm 0,7	2,3 \pm 0,5	3,0 \pm 0,3	4,0 \pm 0,9	3,7 \pm 0,5	3,7 \pm 0,6	4,2 \pm 0,6	#	3,1 \pm 0,5
Fosfatase alcalina (U/L)	431,5\pm14,4*	142,3\pm15,9*	60,5\pm6,5*	212,0\pm12,2*	61,8\pm4,7*	196,3\pm25,6*	58,3\pm5,2*	155,8\pm10,7*	391,0\pm50,0*	161,0\pm27,8*
Bilirrubina total (mg/dL)	0,05 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01	0,21 \pm 0,09	0,56 \pm 0,36	0,25 \pm 0,06	0,18 \pm 0,05	0,16 \pm 0,04	0,10 \pm 0,03	0,04 \pm 0,01	0,14 \pm 0,09
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,08 \pm 0,00	0,18 \pm 0,03	0,06 \pm 0,01	0,17 \pm 0,06	0,09 \pm 0,01	0,08 \pm 0,02	0,06 \pm 0,02	0,07 \pm 0,02	0,09 \pm 0,00	0,13 \pm 0,03

Legenda: #dados não disponíveis. G1/SAL: grupo controle salina; G2/AGO: grupo agomelatina; G3/LOS: grupo losartana; G4/SIN: grupo sinvastatina; G5/MET: grupo metformina. AST: aspartato aminotransferase. ALT: alanina aminotransferase. Gama GT: gama-glutamilttransferase. *Valores de $p < 0,05$ significantes, de acordo com o teste de Tukey.

Fonte: elaborada pelo autor.

Tabela 7 – Média \pm erro padrão da média dos parâmetros bioquímicos analisados e comparação entre sexos - grupos em uso de combinações de fármacos (G6 a G10).

Parâmetro (unidade)	G6/LSM		G7/AL		G8/AS		G9/AM		G10/ALSM	
	fêmeas n=6	machos n=6	fêmeas n=6	machos n=6	fêmeas n=6	machos n=6	fêmeas n=6	machos n=6	fêmeas n=6	machos n=6
Colesterol (mg/dL)	47,3 \pm 6,1	70,2 \pm 3,0	47,5 \pm 4,6	57,7 \pm 4,0	26,6 \pm 2,5	53,0 \pm 3,5	48,8 \pm 3,4	58,7 \pm 4,1	63,2 \pm 5,3	71,8 \pm 3,9
Triglicérides (mg/dL)	42,3\pm7,4*	114,3\pm4,8*	52,3 \pm 7,0	97 \pm 9,6	42,8 \pm 6,4	84,8 \pm 8,1	54,2 \pm 4,6	88,3 \pm 12,3	65,7 \pm 3,7	84,3 \pm 6,9
Glicose (mg/dL)	50,0\pm5,9*	112,0\pm10,3*	54,8\pm5,9*	116,2\pm9,3*	47,8\pm4,4*	117,0\pm6,0*	55,0\pm2,1*	109,3\pm6,6*	68,5 \pm 7,6	87,5 \pm 10,9
AST (U/L)	165,5 \pm 10,0	104,7 \pm 5,6	198,8 \pm 10,4	105,7 \pm 5,6	180,5 \pm 17,3	95,0 \pm 7,1	186,2 \pm 16,7	102,5 \pm 4,8	218,8 \pm 39,8	130,5 \pm 28,8
ALT (U/L)	41,1 \pm 5,1	52,7 \pm 7,6	39,0 \pm 2,3	42,0 \pm 4,6	36,0 \pm 2,6	39,5 \pm 4,6	34,0 \pm 1,6	47,3 \pm 6,2	64,6 \pm 8,0	56,3 \pm 13,7
Creatinina (mg/dL)	0,35 \pm 0,01	0,42 \pm 0,03	0,12\pm0,01*	0,38\pm0,03*	0,12\pm0,01*	0,36\pm0,03*	0,20\pm0,02*	0,39\pm0,02*	0,48 \pm 0,04	0,41 \pm 0,03
Ureia (mg/dL)	34,5 \pm 2,5	36,0 \pm 1,3	30,8 \pm 3,4	36,0 \pm 1,4	25,3 \pm 1,6	37,2 \pm 1,3	34,8 \pm 3,3	34,3 \pm 1,8	38,7 \pm 4,2	36,7 \pm 3,2
Gama GT (U/L)	2,8 \pm 0,4	2,8 \pm 0,3	5,6 \pm 1,2	2,8 \pm 0,6	4,7 \pm 0,9	3,3 \pm 0,6	4,2 \pm 1,0	2,8 \pm 0,3	2,5 \pm 0,3	2,8 \pm 0,3
Fosfatase alcalina (U/L)	49,8\pm6,1*	182,0\pm14,5*	56,5\pm9,0*	189,7\pm13,8*	48,5\pm3,8*	179,7\pm13,4*	55,0\pm4,3*	163,2\pm15,5*	68,0\pm5,2*	163,2\pm15,5*
Bilirrubina total (mg/dL)	0,13 \pm 0,03	0,08 \pm 0,02	0,52\pm0,03*	0,05\pm0,01*	0,49\pm0,03*	0,05\pm0,01*	0,44 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01	0,20 \pm 0,03	0,07 \pm 0,01
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,06 \pm 0,01	0,15 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01	0,13 \pm 0,01	0,06 \pm 0,02	0,12 \pm 0,01	0,09 \pm 0,01	0,14 \pm 0,02	0,16 \pm 0,10	0,11 \pm 0,01

Legenda: G6/LSM: grupo losartana + sinvastatina + metformina; G7/AL: grupo agomelatina + losartana; G8/AS: grupo agomelatina + sinvastatina; G9/AM: grupo agomelatina + metformina; G10/ALSM: grupo agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. AST: aspartato aminotransferase. ALT: alanina aminotransferase. Gama GT: gama-glutamilttransferase. *Valores de $p < 0,05$ significantes, de acordo com o teste de Tukey.

Fonte: elaborada pelo autor.

5.3 Resultados das análises histopatológicas

Por ocasião da eutanásia, procedeu-se com a remoção do fígado, rins, estômago, intestino, baço, pâncreas e coração dos animais de todos os grupos. Os órgãos foram pesados antes de seguirem para a histopatologia, estando as médias dos pesos absolutos apresentadas nas Tabelas 7 e 8.

Após a observação macroscópica, foram confeccionadas lâminas coradas por HE e estas foram lidas em microscópio óptico em objetivas de 40 e 100X. Os achados microscópicos de todos os órgãos examinados (Tabela 3) foram documentados de forma descritiva e as principais alterações verificadas no fígado, rins e baço foram fotomicrografadas em aumentos de 200 e/ou 400X.

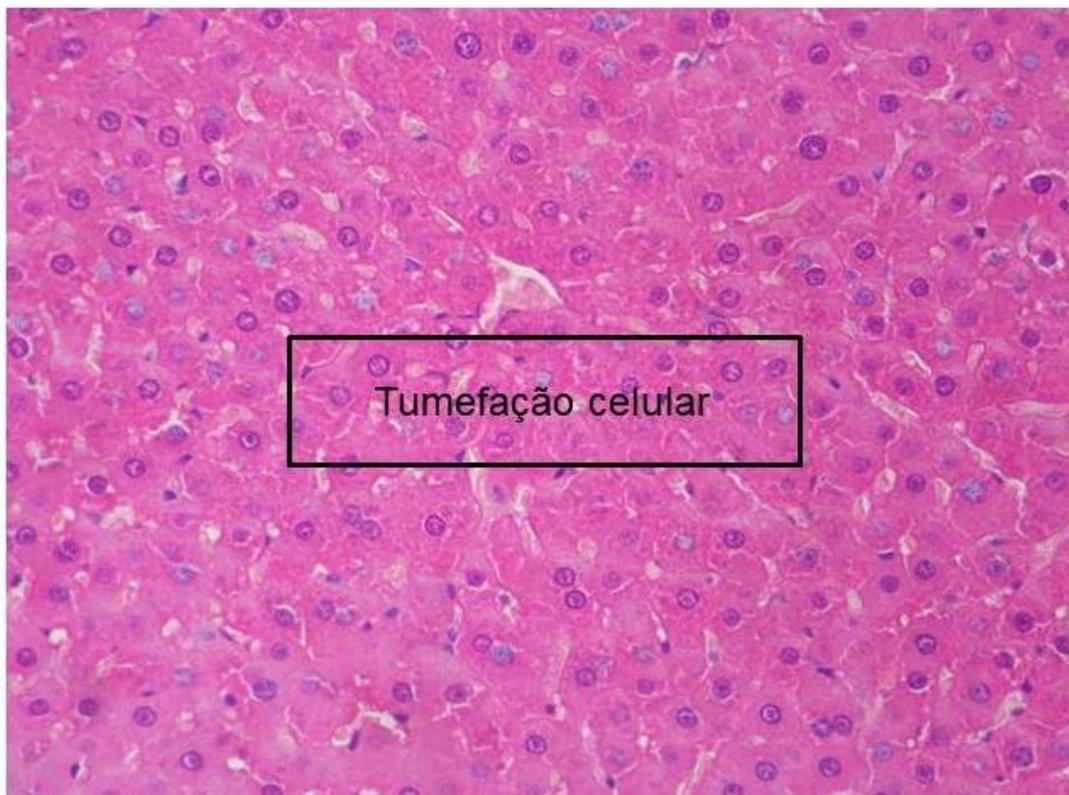
5.3.1 Síntese dos achados histopatológicos por órgão

5.3.1.1 Fígado

Tumefação de hepatócitos foi observada em todos os animais do experimento sendo, no entanto, mais discreta entre os animais do grupo salina (G1), tanto machos quanto fêmeas. A manifestação da tumefação de hepatócitos foi mais intensa nos grupos de machos tratados com agomelatina (G2) (Figura 6) e losartana (G3), presente de modo discreto em machos do grupo sinvastatina (G4) (Figura 7B), e de modo intenso no grupo de fêmeas em uso da associação dos quatro fármacos do estudo (G10/ALSM).

Degeneração hidrópica somente foi observada em machos, ocorrendo em 100% (6/6) dos animais tratados com três fármacos (G6/LSM), de modo focal ou disperso. Este achado também foi verificado em um animal macho tratado com a associação agomelatina + metformina (G9) e em dois animais do grupo sinvastatina (G4), nos quais foram encontradas células espumosas na periferia do órgão.

Figura 6 – Fotomicrografia de fígado do animal 5M (macho) do grupo agomelatina (G2) mostrando tumefação celular. Coloração hematoxilina-eosina, aumento de 400X.



Fonte: próprio autor.

Todas as fêmeas apresentaram hiperplasia das células de Kupffer. Dentre os machos, esta hiperplasia ocorreu nos grupos em que foram administradas as drogas isoladas (G2/AGO, G3/LOS, G4/SIN e G5/MET). Porém, nos grupos em que os fármacos foram utilizados em combinações, observou-se uma diminuição do número de animais com hiperplasia (G6/LSM: em 01 animal de 06; G7/AL: em 03 animais de 06), chegando a não ocorrer em nenhum animal macho dos grupos G8/AS, G9/AM e G10/ALSM.

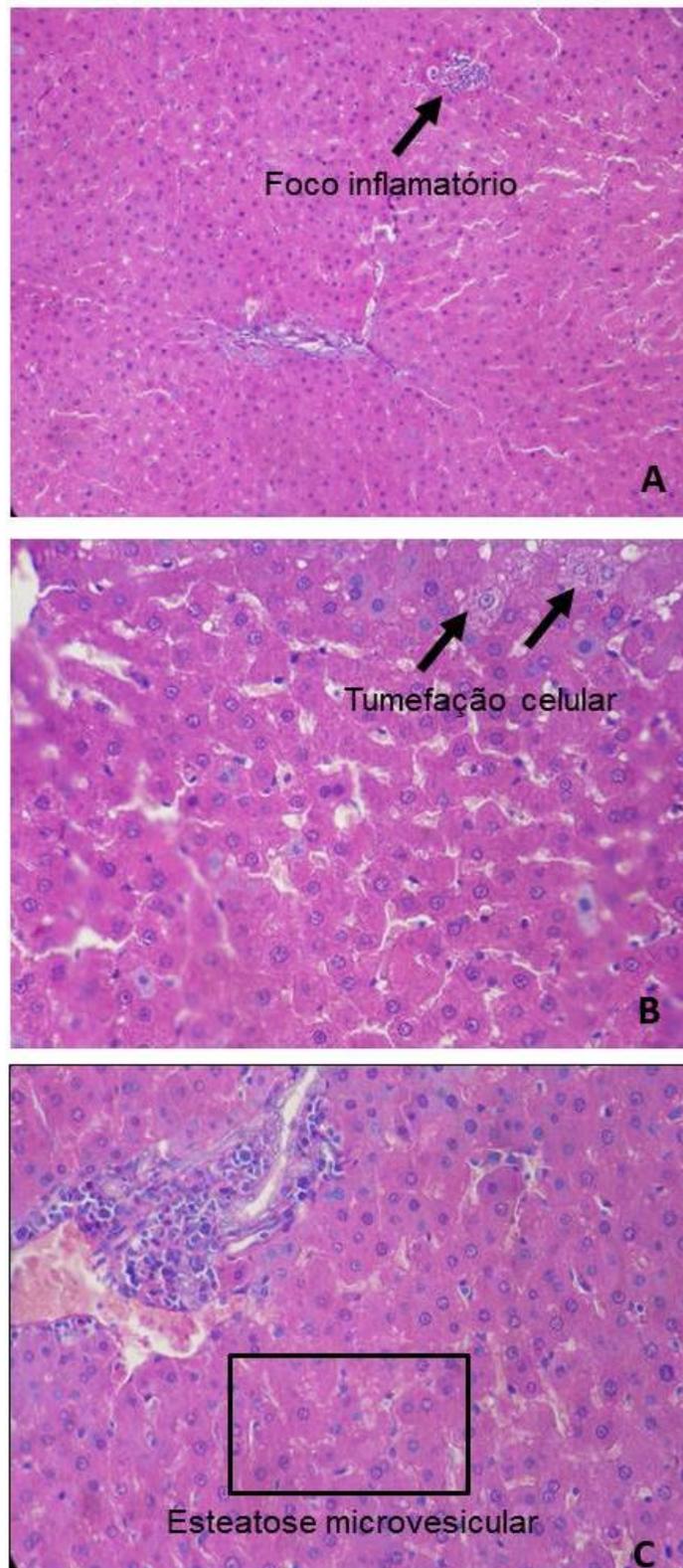
A presença de focos inflamatórios foi observada em todos os grupos de animais fêmeas. No entanto, foram detectados com mais intensidade nos quatro grupos em que a agomelatina estava associada aos fármacos (G7/AL, G8/AS, G9/AM e G10/ALSM) (Figura 8 A e C; Figura 9 A e B). Embora os focos inflamatórios também tenham sido observados nos grupos salina (G1) de fêmeas e machos, apenas metade dos animais deste grupo foram acometidos enquanto, nos demais grupos, especialmente entre as fêmeas, os animais chegaram a ser 100% acometidos. Chama a atenção, porém, a não ocorrência de focos inflamatórios em nenhum animal macho do grupo de fármacos associados sem agomelatina (G6/LSM), bem como no grupo agomelatina +sinvastatina (G8). Nos demais grupos de machos tratados com fármacos isolados, como o grupo sinvastatina (G4) (Figura 7A) e com associações de fármacos

(G7/AL, G9/AM e G10/ALSM), o número de animais que apresentaram focos inflamatórios foi inferior ao número observado nos mesmos grupos de fêmeas, bem como em menor intensidade. As fêmeas, portanto, demonstraram ser mais sensíveis à inflamação no fígado, especialmente quando em uso da agomelatina em associações. Já nos machos, a agomelatina pareceu ter efeito protetor contra inflamação quando associada aos outros fármacos do estudo, embora tenha sido observada no grupo dos machos tratados com a agomelatina isolada (G2), a inflamação de maior intensidade entre todos os grupos (++++), ocorrendo em 5 e 6 animais.

Esteatose em padrão microvesicular foi verificada em quatro fêmeas de diferentes grupos (G3/LOS, G4/SIN, G8/AS e G10/ALSM), chamando a atenção a presença da sinvastatina em três destes grupos (G4/SIN, G8/AS e G10/ALSM). Dentre todos os machos, apenas um animal do grupo sinvastatina (G4) apresentou esteatose microvesicular (Figura 7C). Deste modo, observou-se maior ocorrência deste achado entre os animais fêmeas, bem como uma possível influência da sinvastatina no desenvolvimento desta esteatose.

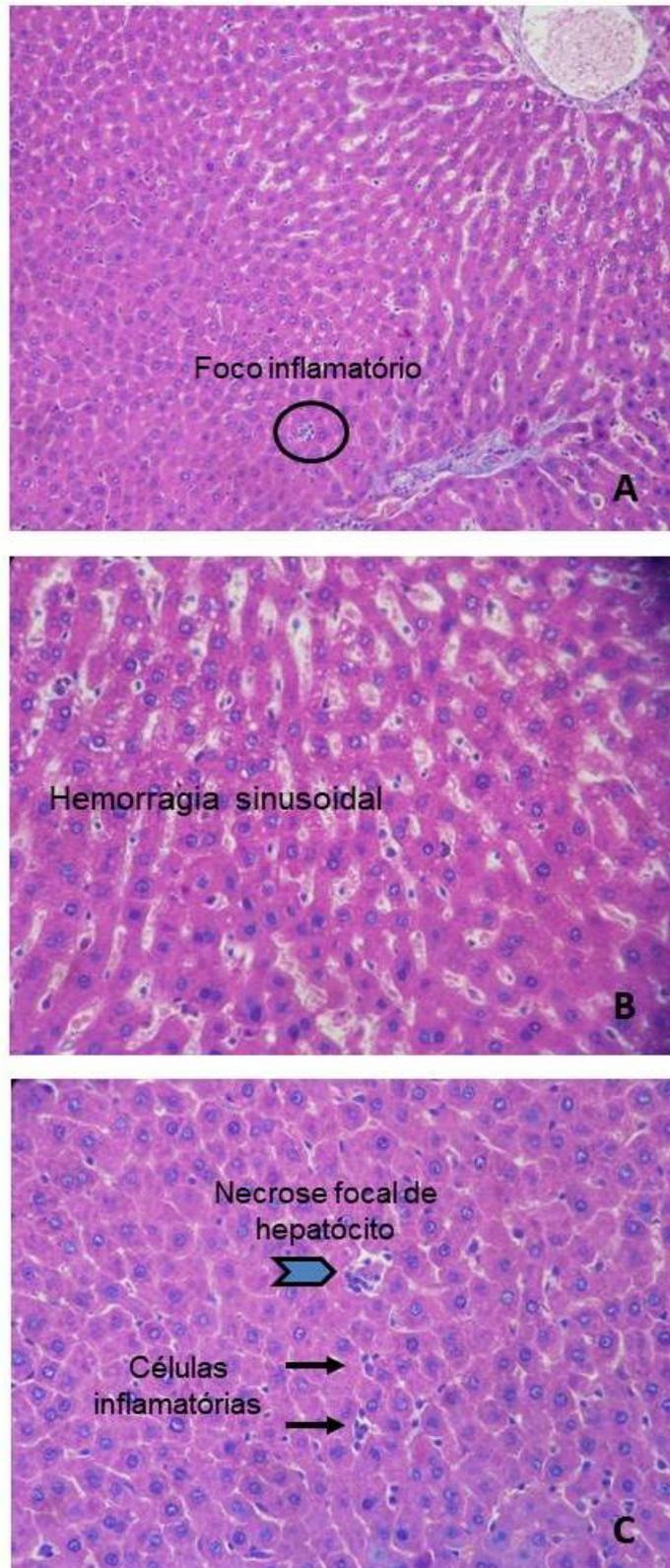
Necrose focal de hepatócitos foi detectada em duas fêmeas tratadas com agomelatina associada a sinvastatina (G8) (Figura 8C e 9B) e a metformina (G9), e também em um macho tratado com sinvastatina em monoterapia (G4). Assim, a agomelatina esteve presente em dois dos três casos de necrose focal detectados, assim como a sinvastatina também esteve em dois dos três casos, inclusive em associação com a agomelatina.

Figura 7 – Fotomicrografias do fígado do animal 3M (macho) do grupo simvastatina (G4) mostrando cordões de hepatócitos com tumefação celular, focos inflamatórios dispersos e esteatose microvesicular. Coloração hematoxilina-eosina, aumentos de 200X (A) e 400X (B e C).



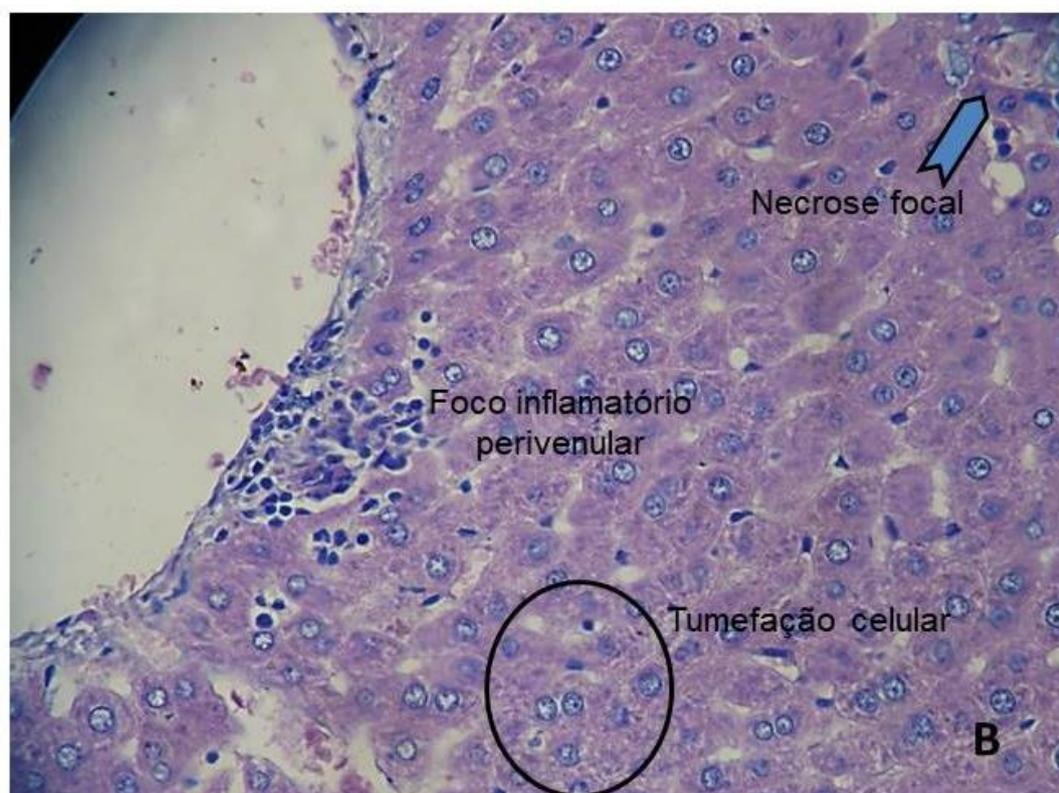
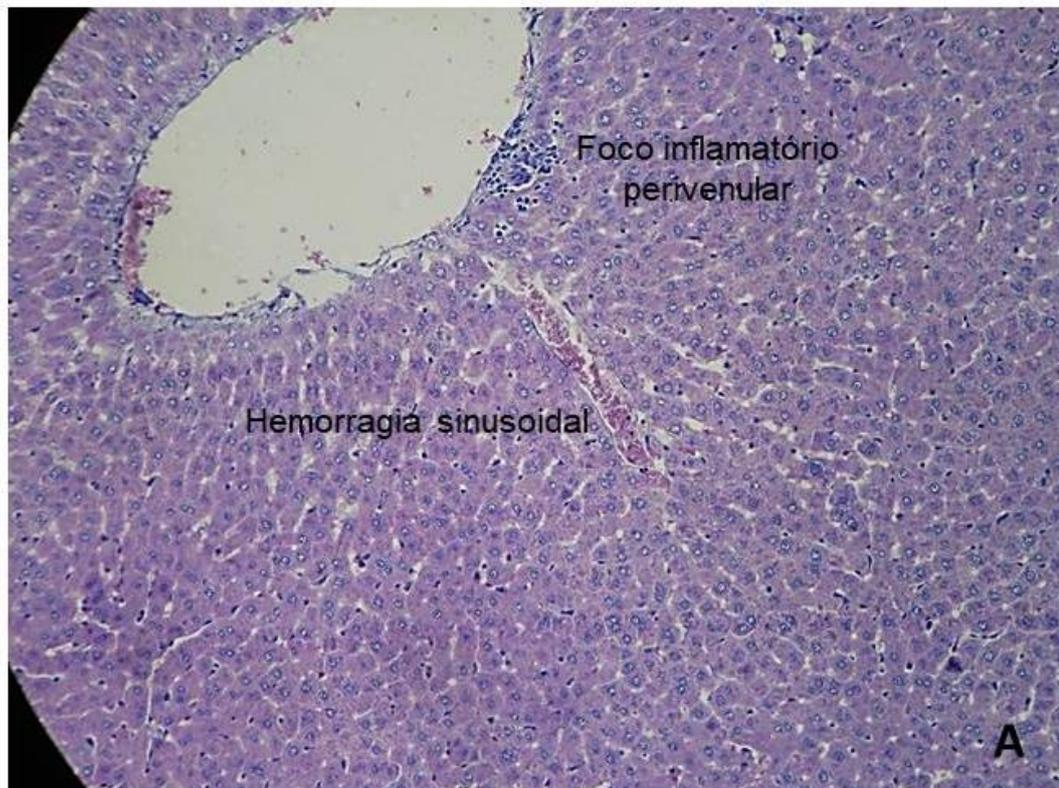
Fonte: próprio autor.

Figura 8 – Fotomicrografias do fígado do animal 6F (fêmea) do grupo agomelatina+sinvastatina (G8) mostrando cordões de hepatócitos desorganizados, hemorragia sinusoidal e focos inflamatórios dispersos, além de necrose focal de hepatócitos. Coloração hematoxilina-eosina, aumentos de 200X (A) e 400X (B e C).



Fonte: próprio autor.

Figura 9 – Fotomicrografias do fígado do animal 5F (fêmea) do grupo agomelatina+metformina (G9) mostrando cordões de hepatócitos com tumefação celular, hemorragia sinusoidal e focos inflamatórios dispersos, além de necrose focal de hepatócitos. Coloração hematoxilina-eosina, aumentos de 200X (A) e 400X (B).



Fonte: próprio autor.

De um modo geral, todos os tratamentos propostos (exceto salina) causaram sinais de toxicidade nos hepatócitos, especialmente nas fêmeas.

O peso médio do fígado, em relação ao grupo controle salina, foi significativamente reduzido ($p < 0,005$) nos machos dos grupos tratados em monoterapia com agomelatina (G2), losartana (G3) ou sinvastatina (G4), e na associação de agomelatina+sinvastatina (G8) (Tabela 8).

5.3.1.2 Rim

Tumefação celular do epitélio tubular foi verificada em 100% das fêmeas, variando de discreta (no grupo G1/SAL) a acentuada, como no grupo tratado com metformina (G5). Em dois casos do grupo G5/MET, a tumefação tubular acentuada levou a colapso da luz de túbulos proximais, sugestiva de edema intersticial, com evidente descamação do epitélio tubular na junção córtico-medular sugerindo necrose tubular aguda (NTA) (Figuras 10 E 11). Nos machos, o número de animais com tumefação do epitélio tubular foi menor, chegando a não ser observada nos grupos G8/AS, G9/AM e G10/ALSM. Mesmo nos machos acometidos, a tumefação prevaleceu como discreta, exceto nos machos do grupo G5, em uso de metformina, nos quais a tumefação observada foi acentuada, tal qual detectado nas fêmeas. No G5/MET dos machos, a acentuada tumefação do epitélio tubular cortical também resultou em áreas de colapsamento da luz tubular, sugerindo edema intersticial, ocorrendo áreas difusas de degeneração vacuolar e áreas focais de descamação do epitélio tubular proximal em um animal, sugestivo de NTA (Figura 12).

Também a vacuolização do epitélio tubular ocorreu em 100% das fêmeas, variando de discreta (grupo G1/SAL) a acentuada, esta última nos três grupos de fármacos associados à agomelatina (G7/AL, G8/AS, G9/AM). Dentre os machos, a vacuolização não foi detectada nos grupos G3/LOS, G9/AM e G10/ALSM, além de acometer menor número de animais nos demais grupos e de forma moderada, em comparação aos respectivos grupos das fêmeas (G1/SAL, G2/AGO, G4/SIN, G5/MET, G7/AL e G8/AS).

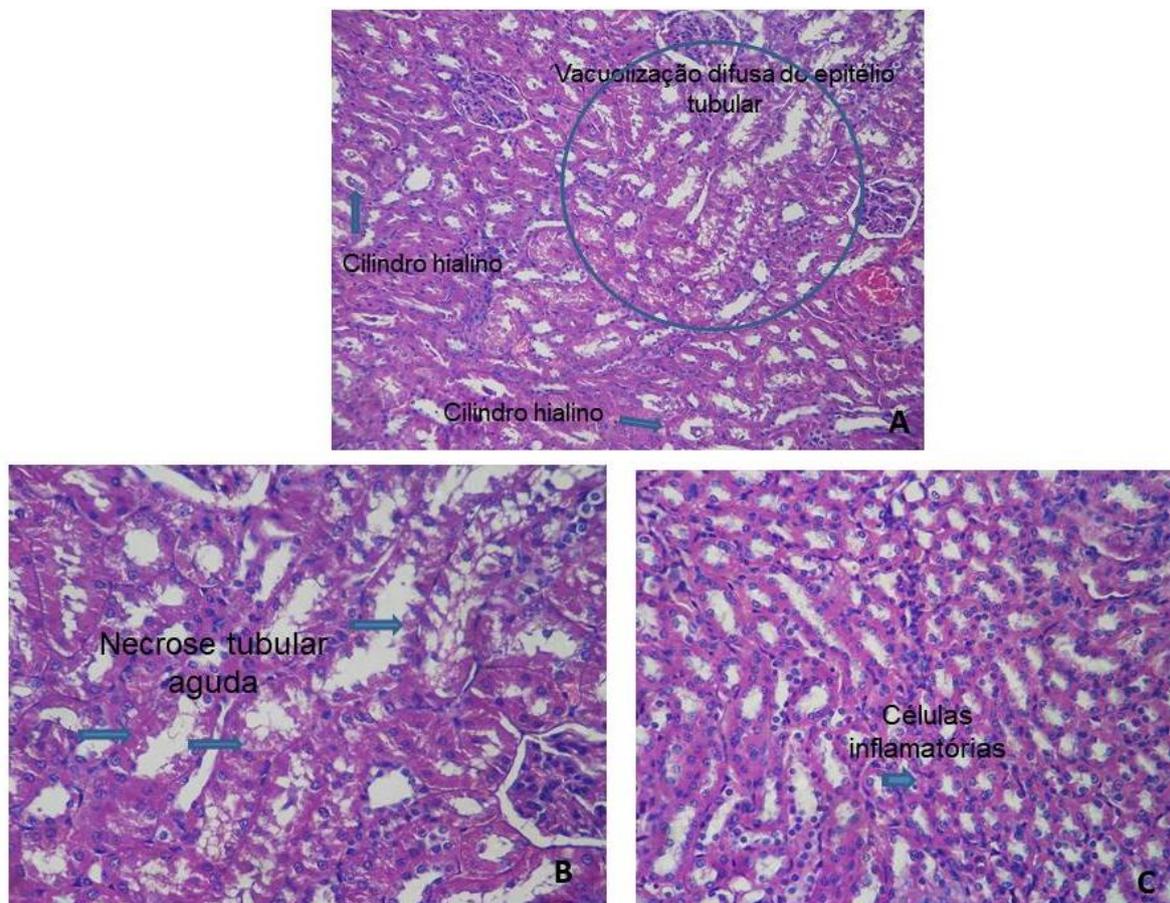
A necrose ou descamação do epitélio tubular ocorreu somente nos grupos de fêmeas e machos tratados com metformina (G5), acometendo 50% de fêmeas deste grupo (3/6) e um macho, parecendo, então, as fêmeas serem mais susceptíveis que os machos à NTA com o uso de metformina isoladamente. Assim, a metformina demonstrou maior potencial nefrotóxico com desenvolvimento de NTA quando usada isoladamente do que quando associada aos outros fármacos do estudo, acometendo 33,33% dos animais tratados (4 animais de 12).

A presença de cilindros hialinos foi verificada em 100% das fêmeas, variando de raros (grupo G1/SAL) a frequentes (G2/AGO, G3/LOS, G4/SIN, G5/MET, G6/LSM, G7/AL, G8/AS, G9/AM e G10/ALSM). Dentre os machos, cilindros hialinos não foram detectados nos grupos de fármacos associados (G6/LSM, G7/AL, G8/AS, G9/AM e G10/ALSM), bem como no grupo em uso de losartana isolada (G3), além de terem sido categorizados como escassos e acometer pequeno número de animais por grupo nos demais grupos (G1/SAL, G2/AGO, G4/SIN e G5/MET). Portanto, a ocorrência de cilindros hialinos foi notadamente maior nas fêmeas.

Células inflamatórias somente foram verificadas em fêmeas e machos tratados com metformina isoladamente (G5) acometendo 100% das fêmeas deste grupo (6/6) e quatro dos seis machos tratados com este fármaco. Deste modo, 10 de 12 animais tratados com metformina (83,33%) apresentaram foco inflamatório nos rins, sendo as fêmeas mais acometidas.

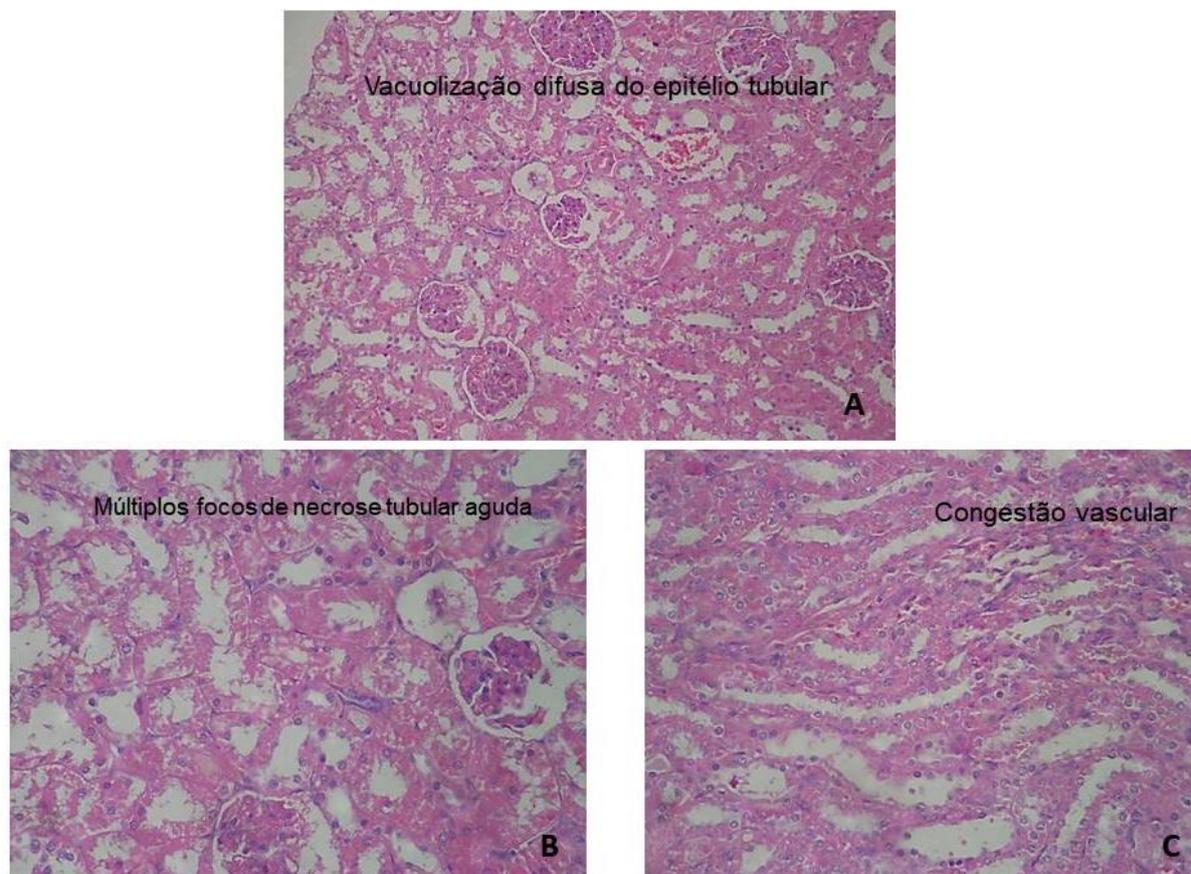
Os rins dos machos tiveram redução significativa no peso médio nos grupos em uso da agomelatina (G2) e losartana (G3) isoladas, bem como na associação agomelatina+sinvastatina (G8), quando comparados com o grupo controle salina ($p < 0,005$) (Tabela 8).

Figura 10 – Fotomicrografias de rim do animal 4F (fêmea) do grupo metformina (G5) mostrando vacuolização difusa do epitélio tubular, cilindros hialinos cortico-medulares, células inflamatórias dispersas e. focos de descamação do epitélio tubular na junção cortico-medular, sugestivo de necrose tubular aguda. Coloração hematoxilina-eosina, aumentos de 200X (A) e 400x (B e C).



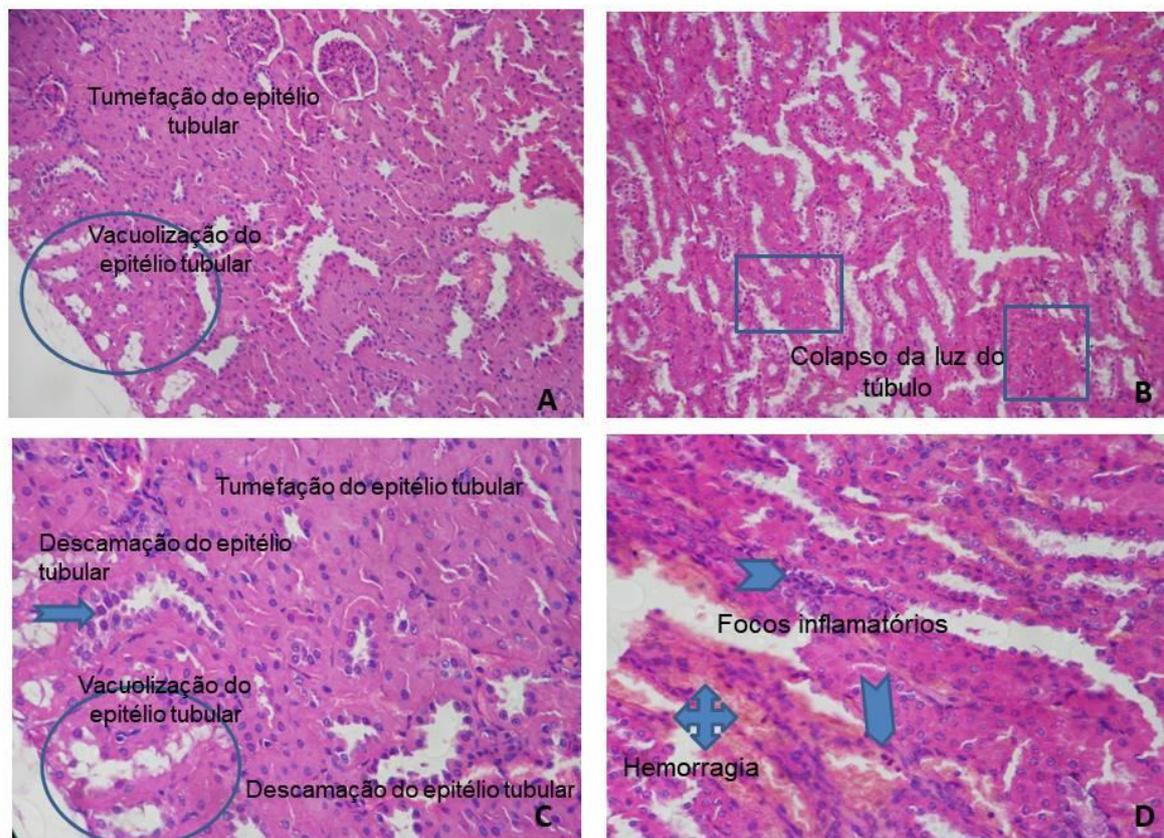
Fonte: próprio autor.

Figura 11 – Fotomicrografias de rim do animal 5F (fêmea) do grupo metformina (G5) vacuolização difusa do epitélio tubular, congestão vascular cortical e múltiplos focos de descamação do epitélio tubular na junção cortico-medular, sugestivo de necrose tubular aguda. Coloração hematoxilina-eosina, aumentos de 200X (A) e 400x (B e C).



Fonte: próprio autor.

Figura 12 – Fotomicrografias de rim do animal 3M (macho) do grupo metformina (G5) mostrando tumefação acentuada do epitélio tubular, por vezes com colapso da luz do túbulo, degeneração vacuolar, descamação do epitélio tubular proximal, congestão vascular cortical e focos de infiltrado linfocitário. Coloração hematoxilina-eosina, aumentos de 200X (A e B) e 400x (C e D).

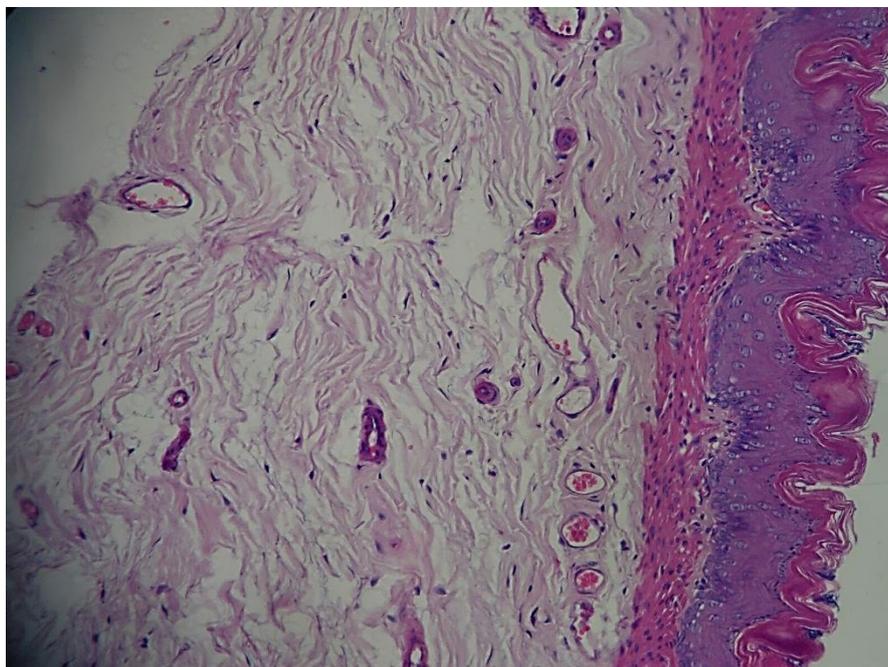


Fonte: próprio autor.

5.3.1.3 Estômago

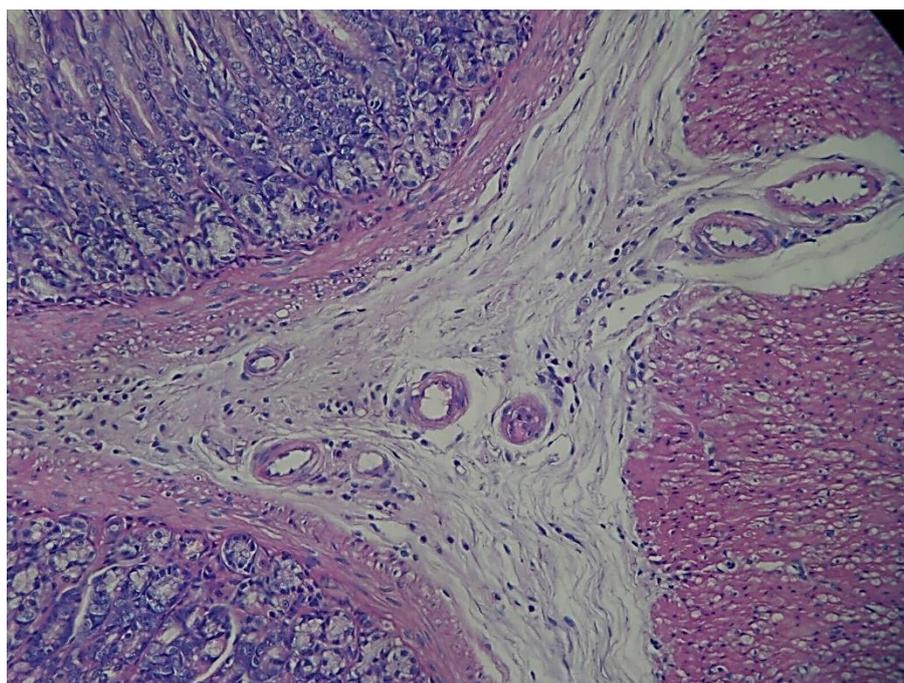
Todos os grupos de fêmeas apresentaram focos inflamatórios no estômago, chegando a ocorrer em 100% dos animais dos grupos G4/SIN, G6/LSM e G7/AL. Apenas uma fêmea do grupo salina (G1) apresentou células inflamatórias no órgão. Dentre os machos, não foi observada a presença de células inflamatórias nos grupos tratados com metformina (G5) e com a associação agomelatina + sinvastatina (G8), bem como no grupo salina (G1). Nos demais grupos (G2/AGO, G3/LOS, G4/SIN, G6/LSM, G7/AL, G9/AM e G10/ALSM), focos inflamatórios foram encontrados em proporções semelhantes encontradas nas fêmeas.

Figura 13 – Fotomicrografia de estômago do animal 4M (macho) do grupo agomelatina (G2) mostrando vasos ectásicos e células de citoplasma granular consistentes com mastócitos localizados em região perivascular na cárdia. Coloração hematoxilina-eosina, aumento de 200X.



Fonte: próprio autor.

Figura 14 – Fotomicrografia de estômago do animal 2F (fêmea) do grupo agomelatina (G2) mostrando pequenos focos inflamatórios na região fúndica. Coloração hematoxilina-eosina, aumento de 200X.



Fonte: próprio autor.

5.3.1.4 *Instestino*

Achatamento de vilos e/ou perda das criptas não foram observados em nenhum animal fêmea, sendo estas alterações detectadas em machos dos grupos tratados com losartana (G3; 2 animais de 6), sinvastatina (G4; 5/6) e em um animal do grupo em uso da associação dos quatro fármacos (G10). Neste último grupo, a perda das criptas foi observada em dois animais. Portanto, as fêmeas não sofreram alterações na arquitetura do epitélio intestinal, ficando estas alterações restritas aos machos dos grupos G3/LOS, G4/SIN e G10/ALSM.

A presença de células inflamatórias foi observada em todos os grupos de fêmeas, exceto no grupo em uso de salina (G1), acometendo 24 das 60 fêmeas (40%) em uso de um ou mais fármacos (G2/AGO, G3/LOS, G4/SIN, G5/MET, G6/LSM, G7/AL, G8/AS, G9/AM e G10/ALSM). Já nos machos, todos os grupos apresentaram células inflamatórias, exceto os animais do grupo em uso da associação de três fármacos (G6/LSM), no qual nenhum animal apresentou inflamação no intestino. Deste modo, células inflamatórias foram detectadas em 31 de 57 animais machos cujo intestino foi analisado (cerca de 54%) em vários grupos experimentais, exceto em G6/LSM.

Vacuolização ou edema das células do epitélio intestinal foi incomum, ocorrendo em apenas uma fêmea do grupo sinvastatina (G4) e em um macho do grupo em uso dos quatro fármacos (G10/ALSM).

As camadas submucosa e muscular, em geral, encontravam-se preservadas, não ocorrendo alterações em nenhum grupo de fêmeas. Foi observada a presença de folículo linfoide na submucosa em um animal macho de cada um dos seguintes grupos: losartana (G3), associação de três fármacos (G6/LSM) e associação de quatro fármacos (G10/ALSM). Também apenas nos machos foi verificada a presença de vasos ectásicos em cinco dos seis machos do grupo em uso de sinvastatina (G4).

De modo geral, os machos foram mais susceptíveis às alterações intestinais em relação às fêmeas, com especial acometimento dos animais dos grupos G3/LOS, G4/SIN, G6/LSM e G10/ALSM.

5.3.1.5 *Baço*

Acentuada presença de hemossiderófagos foi verificada em todos os grupos de fêmeas em uso de um ou mais fármacos, correspondendo a 80% das amostras analisadas (Figura 15). No grupo em uso da associação agomelatina + sinvastatina (G8), de modo semelhante ao

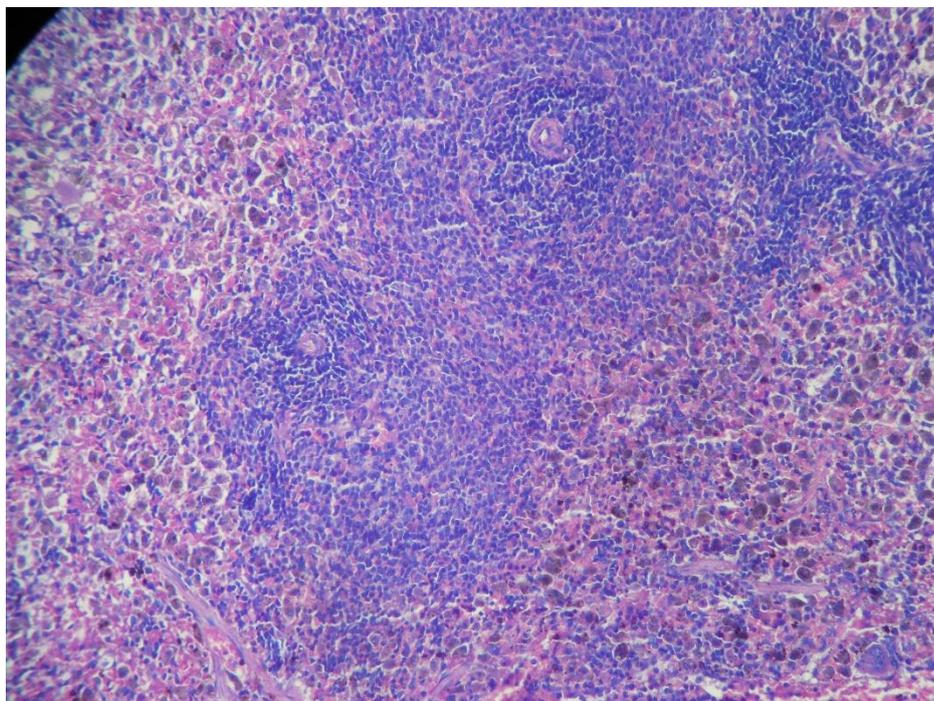
grupo controle salina (G1), verificou-se a presença moderada de hemossiderófagos. Estes achados foram confirmados através de hemograma, onde foi demonstrada significativa redução do número de eritrócitos nas fêmeas, especialmente nos grupos em uso de fármacos combinados (G6/LSM, G7/AL, G8/AS, G9/AM a G10/ALSM), todos com $p < 0,0001$ em relação ao grupo controle salina (G1) Também a taxa de hemoglobina das fêmeas foi inferior em relação ao grupo salina (G1), especialmente nos grupos que usaram a agomelatina associada com sinvastatina (G8/AS; $p = 0,0371$), com metformina (G9/AM; $p = 0,0296$) e com os outros três fármacos (G10/ALSM; $p = 0,0219$).

Dentre os machos, o número total de animais em que a presença acentuada de hemossiderófagos foi verificada revelou-se inferior ao número de fêmeas afetadas, ocorrendo em 32 dos 54 animais machos (aproximadamente 59%) que tiveram o baço analisado (Figura 16). O hemograma dos machos demonstrou redução significativa de hemoglobina em alguns grupos em relação ao grupo controle salina (G1), mas não em relação ao número de eritrócitos. As taxas de hemoglobina significativamente menores em relação ao controle ($p < 0,05$) ocorreram em grupos cuja presença de hemossiderófagos na histopatologia foi acentuada (G3/LOS, G5/MET, G6/LSM e G7/AL). Entretanto, tal associação não foi verificada no grupo G10, no qual houve presença acentuada de hemossiderófagos, mas a taxa de hemoglobina foi semelhante ao controle salina (G1).

Presença de megacariócitos foi observada em 100% das fêmeas, porém de forma rara no grupo salina (G1), discreta nos grupos G8/AS e G9/AM, moderada em G6/ALSM, G7/AL e G10/ALSM e acentuada em todos os grupos em uso dos fármacos isolados (G2/AGO, G3/LOS, G4/SIN e G5/MET) (Figura 15).

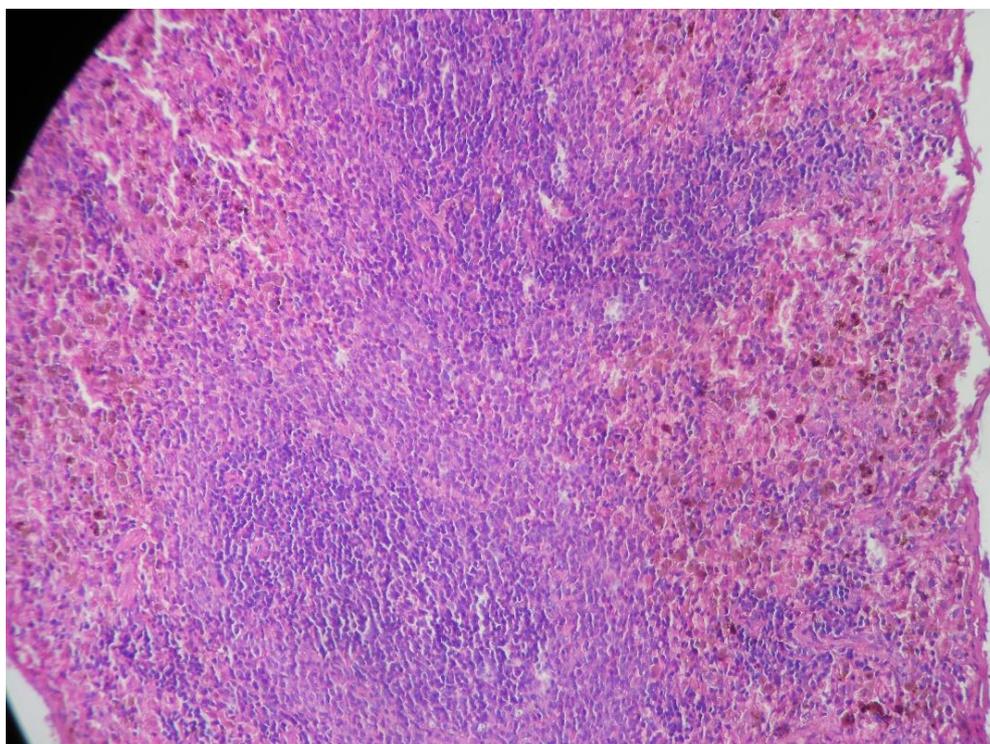
Dentre os machos, observou-se, em todos os grupos experimentais, um menor número de animais apresentando megacariócitos e esta presença ocorrendo de forma mais discreta em relação às fêmeas. Exceção para os grupos em uso de losartana (G3) e sinvastatina (G4) (Figura 16), nos quais a presença de megacariócitos foi acentuada, ocorrendo em 100% e 50% dos animais destes grupos, respectivamente.

Figura 15 – Fotomicrografia de baço do animal 6F (fêmea) do grupo metformina (G5) mostrando a presença acentuada de hemossiderófagos e de megacariócitos. Coloração hematoxilina-eosina, aumento de 200X.



Fonte: próprio autor.

Figura 16 – Fotomicrografia de baço do animal 4M (macho) do grupo sinvastatina (G4) mostrando a presença acentuada de hemossiderófagos e de megacariócitos. Coloração hematoxilina-eosina, aumento de 200X.



Fonte: próprio autor.

5.3.1.6 Pâncreas

O pâncreas foi um órgão pouco afetado pelos fármacos do estudo, não sendo observadas quaisquer alterações nos grupos em uso dos fármacos isolados, tanto em fêmeas quanto em machos. No entanto, em uma das seis fêmeas do grupo em uso de três fármacos (G6/LSM), observou-se vacuolização acinar, o que também foi verificado em dois dos cinco machos do grupo tratado com quatro fármacos (G10/ALSM), sugerindo possível tendência a um aumento de toxicidade sobre o pâncreas em situações de uso de múltiplos fármacos.

5.3.1.7 Coração

A presença de infiltrado inflamatório mononuclear foi verificada no tecido cardíaco de um fêmea do grupo tratado com sinvastatina (G4), bem como em animais tratados com associações de fármacos (G6/LSM, em 3 de 6 fêmeas; G10/ALSM, em 2 de 6 animais). Chama a atenção o uso da sinvastatina, isolada ou em associação, em todas as fêmeas em que foi encontrado o infiltrado inflamatório, ocorrendo, portanto, em 6 de 18 fêmeas fazendo uso de sinvastatina (cerca de 33%) e em 10% da amostra total de fêmeas (6 de 60).

Nos machos, o número de animais em que foi verificada a presença de infiltrado inflamatório mononuclear duplicou, acometendo 12 de 60 animais (20%), distribuindo-se nos grupos G3/LOS (2/6 animais), G4/SIN (2/6), G5/MET (3/6), G7/AL (2/6), G8/AS (1/6) e G10/ALSM (2/6).

Os grupos tratados com agomelatina (G2), losartana (G3) e associações agomelatina+losartana (G7) e agomelatina+sinvastatina (G8) tiveram redução significativa do peso médio do coração em relação ao grupo controle salina ($p < 0,005$) (Tabela X).

5.3.2 Peso dos órgãos

Os órgãos dos animais foram pesados logo após serem coletados na eutanásia, antes de serem colocados no fixador e seguirem para a histopatologia. As médias \pm erro padrão da média dos pesos absolutos dos órgãos de machos e de fêmeas estão apresentadas nas Tabelas 8 e 9, respectivamente. Valores de $p < 0,05$, de acordo com o teste de Tukey, foram considerados significantes comparados ao controle salina.

Tabela 8 – Média \pm erro padrão da média do peso absoluto dos órgãos dos animais machos.

Órgão/Grupo	G1/SAL	G2/AGO	G3/LOS	G4/SIN	G5/MET	G6/LSM	G7/AL	G8/AS	G9/AM	G10/ALSM
Fígado	13,8 \pm 0,6	11,0 \pm 0,5*	10,2 \pm 0,4*	10,9 \pm 0,6*	12,0 \pm 0,5	13,4 \pm 0,5	12,6 \pm 0,4	11,6 \pm 0,5*	2,5 \pm 0,5	12,5 \pm 0,3
Rim direito	1,2 \pm 0,2	1,1 \pm 0,03	1,0 \pm 0,02*	1,1 \pm 0,05	1,2 \pm 0,03	1,2 \pm 0,06	1,2 \pm 0,03	1,1 \pm 0,04	1,2 \pm 0,04	1,2 \pm 0,04
Rim esquerdo	1,3 \pm 0,06	1,1 \pm 0,03*	1,0 \pm 0,04*	1,1 \pm 0,06	1,2 \pm 0,05	1,2 \pm 0,04	1,2 \pm 0,04	1,1 \pm 0,02*	1,2 \pm 0,04	1,2 \pm 0,05
Baço	0,7 \pm 0,02	0,6 \pm 0,03	0,6 \pm 0,03	0,7 \pm 0,05	0,7 \pm 0,06	0,7 \pm 0,01	0,7 \pm 0,03	0,6 \pm 0,01	0,7 \pm 0,02	0,7 \pm 0,02
Pâncreas	1,5 \pm 0,1	1,3 \pm 0,1	1,4 \pm 0,2	1,4 \pm 0,2	1,3 \pm 0,07	1,4 \pm 0,2	1,5 \pm 0,2	1,4 \pm 0,1	1,3 \pm 0,1	1,7 \pm 0,1
Estômago	2,0 \pm 0,08	1,9 \pm 0,07	1,8 \pm 0,08	1,9 \pm 0,06	2,0 \pm 0,07	2,3 \pm 0,2	2,1 \pm 0,07	2,0 \pm 0,1	2,1 \pm 0,1	2,1 \pm 0,06
Intestino	8,5 \pm 0,3	7,92 \pm 0,4	7,7 \pm 0,2	7,5 \pm 0,5	8,7 \pm 0,4	8,4 \pm 0,4	7,6 \pm 0,6	7,4 \pm 0,3	8,7 \pm 0,7	8,3 \pm 0,4
Coração	1,2 \pm 0,05	1,1 \pm 0,05*	1,1 \pm 0,06*	1,1 \pm 0,04	1,2 \pm 0,05	1,1 \pm 0,02	1,1 \pm 0,02*	1,0 \pm 0,02*	1,1 \pm 0,05	1,1 \pm 0,04

Legenda: G1/SAL: grupo controle salina; G2/AGO: grupo agomelatina; G3/LOS: grupo losartana; G4/SIN: grupo sinvastatina; G5/MET: grupo metformina; G6/LSM: grupo losartana + sinvastatina + metformina; G7/AL: grupo agomelatina + losartana; G8/AS: grupo agomelatina + sinvastatina; G9/AM: grupo agomelatina + metformina; G10/ALSM: grupo agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. *Valores com significância estatística em relação ao controle salina ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

Fonte: elaborada pelo autor.

Tabela 9 – Média \pm erro padrão da média do peso absoluto dos órgãos dos animais fêmeas.

Órgão/Grupo	G1/SAL	G2/AGO	G3/LOS	G4/SIN	G5/MET	G6/LSM	G7/AL	G8/AS	G9/AM	G10/ALSM
Fígado	8,3 \pm 0,3	7,3 \pm 0,3	7,9 \pm 0,6	7,4 \pm 0,2	8,3 \pm 0,96	8,0 \pm 0,4	7,6 \pm 0,22	6,7 \pm 0,2**	7,5 \pm 0,2	8,3 \pm 0,4
Rim direito	0,9 \pm 0,02	0,8 \pm 0,03	0,8 \pm 0,03	0,8 \pm 0,01	0,9 \pm 0,02	0,95 \pm 0,04	0,9 \pm 0,02	0,8 \pm 0,01	0,9 \pm 0,03	0,9 \pm 0,04
Rim esquerdo	0,9 \pm 0,03	0,8 \pm 0,02	0,9 \pm 0,02	0,8 \pm 0,01	0,8 \pm 0,02*	0,9 \pm 0,02	0,9 \pm 0,01	0,8 \pm 0,02*	0,8 \pm 0,02*	0,9 \pm 0,02
Baço	0,6 \pm 0,04*	0,5 \pm 0,02**	0,5 \pm 0,01**	0,5 \pm 0,01**	0,5 \pm 0,03**	0,5 \pm 0,01**	0,5 \pm 0,01*	0,5 \pm 0,02***	0,5 \pm 0,02**	0,6 \pm 0,01*
Pâncreas	1,0 \pm 0,09	1,0 \pm 0,15	1,2 \pm 0,1	1,1 \pm 0,09	1,1 \pm 0,1	0,9 \pm 0,06	1,1 \pm 0,09	1,0 \pm 0,05	0,9 \pm 0,05	0,8 \pm 0,08
Estômago	1,7 \pm 0,1	1,5 \pm 0,06	1,5 \pm 0,08	1,6 \pm 0,1	1,5 \pm 0,07	1,8 \pm 0,08	1,6 \pm 0,06	1,5 \pm 0,1*	1,7 \pm 0,04	1,8 \pm 0,08
Intestino	6,8 \pm 0,6	5,9 \pm 0,4	6,4 \pm 0,6	6,1 \pm 0,4	7,0 \pm 0,4	6,1 \pm 0,3	5,8 \pm 0,23	5,6 \pm 0,24	5,8 \pm 0,2	5,9 \pm 0,24
Coração	0,8 \pm 0,01	0,8 \pm 0,04	0,8 \pm 0,02	0,8 \pm 0,01	0,9 \pm 0,03	0,8 \pm 0,02	0,8 \pm 0,02	0,7 \pm 0,01	0,8 \pm 0,02	0,8 \pm 0,05

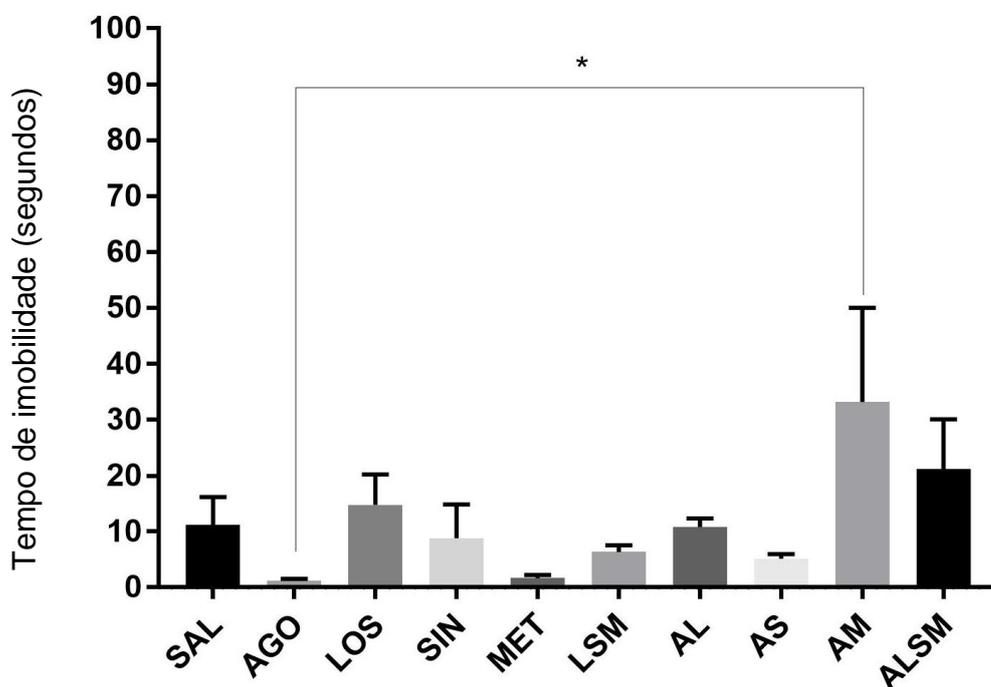
Legenda: G1/SAL: grupo controle salina; G2/AGO: grupo agomelatina; G3/LOS: grupo losartana; G4/SIN: grupo sinvastatina; G5/MET: grupo metformina; G6/LSM: grupo losartana + sinvastatina + metformina; G7/AL: grupo agomelatina + losartana; G8/AS: grupo agomelatina + sinvastatina; G9/AM: grupo agomelatina + metformina; G10/ALSM: grupo agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina.. *Valores com significância estatística em relação ao controle salina ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Fonte: elaborada pelo autor.

5.4 Resultado do teste do nado forçado

O teste do nado forçado foi realizado na segunda etapa do experimento, onde foram avaliados apenas os animais machos. O Gráfico 91 demonstra que o tempo de imobilidade dos animais foi significativamente maior no grupo que utilizou agomelatina+metformina (G9/AM) em relação ao grupo que utilizou agomelatina isoladamente ($p=0,00469$), de modo que a metformina parece ter influenciado na redução da atividade antidepressiva da agomelatina.

Gráfico 91 – Resultado do teste do nado forçado nos animais machos com grupos experimentais comparados entre si ($n=6$ animais/grupo).



Legenda: SAL: salina; AGO: agomelatina; LOS: losartana; SIN: sinvastatina; MET: metformina; LSM: losartana + sinvastatina + metformina; AL: agomelatina + losartana; AS: agomelatina + sinvastatina; AM: agomelatina + metformina; ALSM: agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina. *Valor de $p<0,0046$ - significativo, de acordo com o teste de Tukey. As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: elaborada pelo autor.

6 DISCUSSÃO

A terapia medicamentosa múltipla é comum na prática clínica de psiquiatria, em que antidepressivos são frequentemente combinados com fármacos usados para tratar outros distúrbios psiquiátricos. Ao mesmo tempo, muitos pacientes psiquiátricos são acompanhados e tratados em outras especialidades médicas por apresentarem diferentes comorbidades. Assim, o potencial em acarretar ou sofrer influência de interações medicamentosas (IM) representa um importante aspecto na escolha de um antidepressivo (SPINA, TRIFIRO, CARACI, 2012).

A polifarmácia acarreta alto risco de interação entre fármacos. Embora certas combinações de medicamentos possam ser usadas com vantagem, em muitos casos, podem culminar em prejuízos ao indivíduo, por resultarem em diminuição da eficácia ou aumento da toxicidade de um ou de todos os fármacos utilizados de modo concomitante. Deste modo, a escolha do antidepressivos com baixo potencial de interações medicamentosas é desejável, especialmente em pacientes idosos que, comumente, fazem uso de vários medicamentos simultaneamente (SPINA, TRIFIRO, CARACI, 2012).

A ocorrência de diferentes doenças crônicas em um mesmo indivíduo, levando ao uso de múltiplos fármacos de modo concomitante, mesmo aqueles já em uso na prática clínica, tem sido estudada experimentalmente por alguns autores, que investigam possíveis alterações em parâmetros hematológicos, bioquímicos e histopatológicos diante destas combinações, em animais e em humanos. Sengupta e colaboradores (2016) por exemplo, analisaram a associação de pioglitazona (hipoglicemiante oral) e telmisartan (anti-hipertensivo) em ratos, uma investigação preliminar que demonstrou, através destes três parâmetros, que a combinação dos dois fármacos foi segura em animais, mesmo em doses superiores às doses humanas preconizadas. Torres e colaboradores (2011) avaliaram, em humanos, o uso da combinação de rosiglitazona (hipoglicemiante oral) com losartana (anti-hipertensivo) em indivíduos com esteatohepatite não alcoólica (NASH) e constataram que associação não impactou positiva ou negativamente a evolução da NASH, parecendo ser segura para uso nesses pacientes.

O uso simultâneo de antidepressivos e anti-hipertensivos, e suas potenciais interações, também tem sido investigado. Braz e colaboradores (2018) exemplificam a utilização de inibidores seletivos da recaptção de serotonina (ISRS), como a paroxetina e a fluoxetina, concomitantemente ao uso de fármacos anti-hipertensivos beta-bloqueadores, culminando em intensa queda na pressão arterial e bradicardia como frequente reações adversas. Segundo os autores, os ISRS são fortes inibidores da enzima CY2D6, inibindo o

metabolismo dos beta-bloqueadores e, conseqüentemente, potencializando a ação destes anti-hipertensivos, configurando em uma interação farmacocinética.

Em geral, em virtude de mecanismos de ação mais seletivos, os antidepressivos mais recentes, a exemplo dos ISRS e da própria agomelatina, apresentam um risco relativamente baixo para interações farmacodinâmicas, pelo menos em comparação com antidepressivos de primeira geração (inibidores da monoamina oxidase e antidepressivos tricíclicos). Por outro lado, são suscetíveis a interações farmacocinéticas, uma vez que são extensivamente metabolizados no fígado pelas isoenzimas do citocromo P450 (CYP) e, portanto, sujeitos a interações medicamentosas de base metabólica (SPINA, TRIFIRO, CARACI, 2012).

A agomelatina é um antidepressivo que apresenta importante e reconhecida hepatotoxicidade, o que limita sua aplicação clínica. Alguns estudos têm sido conduzidos para elucidar outros potenciais efeitos tóxicos da agomelatina, como o realizado por Yang e colaboradores (2019) recentemente. Os autores avaliaram parâmetros hematológicos, bioquímicos, pesos de órgãos, e realizaram exames histopatológicos em ratos *Spragle-Dawley* e os resultados mostraram que a agomelatina resultou em efeitos adversos nas plaquetas, fígado e rim, com diferenças observadas entre os sexos nos parâmetros avaliados.

De acordo com Spina, Trifiro e Caraci (2012), a agomelatina não apresenta potencial inibitório sobre as isoenzimas CYP, mas é susceptível a sofrer interações medicamentosas farmacocinéticas com fluvoxamina, ciprofloxacina, amiodarona, mexiletina e zileuton, pelo mecanismo de inibição do metabolismo da agomelatina mediado pela CYP1A2, que pode culminar no aumento acentuado das concentrações de agomelatina, levando à ocorrência de efeitos adversos. Assim, essas combinações de medicamentos são contraindicadas, devendo ser evitadas na prática clínica.

As interações medicamentosas (IM) que surgem pela alteração da farmacocinética de um medicamento por outros preocupam a indústria farmacêutica, agências reguladoras de medicamentos, serviços de saúde, profissionais prescritores e pacientes, devendo ser amplamente investigadas e seus mecanismos elucidados sempre que possível. Uma compreensão mais completa das diferentes isoenzimas do citocromo P450 e transportadores de drogas tem levado à busca de novos métodos para prever e prevenir interações medicamentosas clinicamente relevantes. Há também um aumento reconhecimento da necessidade de identificar o impacto de polimorfismos farmacogenéticos nas IM. Requisitos regulamentares mais rigorosos contribuem para a indústria farmacêutica identificar e classificar os fármacos como inibidores e indutores do citocromo P450, testando o efeito das interações medicamentosas na

presença de enzimas polimórficas e avaliando vários medicamentos potencialmente interagentes ao serem utilizados simultaneamente (TANNENBAUM, SHHEHAN, 2014).

Neste contexto de polifarmácia e de interações medicamentosas, o presente trabalho procurou analisar o efeito da associação do antidepressivo agomelatina com fármacos de uso crônico comumente utilizados pela população (losartana, sinvastatina e metformina) sobre parâmetros hematológicos, bioquímicos e histopatológicos de ratos *Wistar* machos e fêmeas após tratamento subcrônico, bem como avaliar a interferência das associações no perfil antidepressivo da agomelatina através de um teste comportamental.

De modo geral, tanto as análises hematológicas, quanto bioquímicas e histopatológicas revelaram importantes diferenças entre sexos. A literatura demonstra que, entre os seres humanos, há diferentes respostas dos sexos masculino e feminino ao uso de fármacos e que o perfil farmacocinético e toxicocinético de medicamentos é diferente nos dois sexos nos níveis de absorção, distribuição, metabolismo e eliminação. Estas diferenças que ocorrem entre os sexos podem influenciar os níveis plasmáticos e, por vezes, afetar a eficácia e perfil farmacológico e toxicológico dos fármacos, bem como ser responsáveis por uma sensibilidade diferente dos sexos aos efeitos adversos a medicamentos (MARAZZITI *et al.*, 2013). Entre animais experimentais, as diferentes respostas dos sexos aos fármacos também têm sido amplamente descritas (GOCHFELD, 2007; SABOLIC *et al.*, 2007; TREVISAN *et al.*, 2012).

O sexo feminino, tanto em humanos como em animais, tem sido caracterizado como fator de risco para reações adversas clinicamente relevantes a medicamentos (ANDERSON, 2008). Para Trevisan e colaboradores (2012), sexo é uma variável biológica básica e intrínseca aos grupos analisados em um estudo e que precisa ser levando em consideração, não devendo ser um fator de confusão nas pesquisas. O aumento do risco devido a diferenças sexuais hormonais e metabólicas, influenciando na farmacocinética e na farmacodinâmica, bem como a possibilidade das mulheres receberem mais medicamentos e concentrações mais elevadas por quilo de peso corporal do que os homens, podem estar relacionados com a maior sensibilidade do sexo feminino ao uso de fármacos (ANDERSON, 2008).

Além das diferenças observadas entre sexos nos diversos grupos de fármacos e combinações estudados em diferentes parâmetros, outro achado importante foi a influência da agomelatina sobre aspectos diversos nos perfis hematológicos, bioquímicos e histopatológicos analisados, ora apresentando-se como fator de risco para alterações, ora parecendo ser fator protetor, quando utilizada em terapia combinada com os fármacos investigados, influências estas que também foram observadas entre sexos.

No presente estudo, as análises hematológicas, de um modo geral, revelaram diferenças importantes entre sexos, sendo observado que, dentre os animais fêmeas, os grupos em uso de fármacos em associações apresentaram relevantes alterações dos parâmetros hematológicos em relação aos grupos em monoterapia. Entre os animais machos, este não foi um achado evidenciado. Portanto, as fêmeas foram mais sensíveis que os machos ao uso concomitante de múltiplos fármacos em relação a alterações dos parâmetros hematológicos.

Dentre os achados mais significativos na série branca do hemograma, observou-se a redução significativa no número de leucócitos totais em todos os grupos de fêmeas que fizeram uso da agomelatina em associação com os demais fármacos, bem como na contagem diferencial de linfócitos absolutos, quando comparados ao grupo em uso da agomelatina em monoterapia. Estas ocorrências não foram verificadas entre os machos, o que pode sinalizar uma maior susceptibilidade das fêmeas em desenvolver leucopenia com linfopenia diante do uso da agomelatina em combinação com importantes fármacos de uso crônico – a losartana, a metformina e a sinvastatina.

Também foi verificada redução significativa no número de leucócitos totais em todos os grupos de fêmeas que fizeram uso da sinvastatina em associação com os demais fármacos, bem como na contagem diferencial de leucócitos absolutos, quando comparados ao grupo em uso da sinvastatina em monoterapia, não sendo verificada esta ocorrência entre os machos. Portanto, as fêmeas parecem ser mais susceptíveis em desenvolver leucopenia com linfopenia também diante do uso da sinvastatina em combinação com agomelatina, losartana e metformina.

Os animais machos, por sua vez, tiveram redução significativa no número de leucócitos e de linfócitos absolutos em relação às fêmeas, quando em uso de sinvastatina em monoterapia, demonstrando potencial susceptibilidade dos machos ao uso deste fármaco.

Em pesquisa realizada por Sengupta e colaboradores (2016) utilizando um hipoglicemiante oral (pioglitazona) e um anti-hipertensivo (telmisartan) isoladamente ou associados em ratos, simulando a situação de tratamento concomitante de duas doenças crônicas degenerativas bastante comuns na população mundial (DM2 e HAS, respectivamente), não observaram a influência dos fármacos na análise da série branca do hemograma dos animais.

Em nosso trabalho, o eritrograma mostrou-se passível de interferência ao uso dos fármacos avaliado. Nas fêmeas, todos os grupos que fizeram uso de combinações de dois, três ou quatro fármacos, apresentaram redução significativa no número de eritrócitos, quando comparados com o grupo controle e com os respectivos grupos de fármacos usados em monoterapia. Já entre os machos, a diminuição de eritrócitos somente foi observada no grupo

em que fez uso de agomelatina associada a sinvastatina, em relação a cada um dos dois fármacos isolados. Deste modo, observou-se que as fêmeas foram bem mais afetadas que os machos em relação à contagem de hemácias.

O percentual em volume ocupado pelos eritrócitos no volume total de sangue, que corresponde ao hematócrito, também avaliado no eritrograma, apresentou-se reduzido em todos os grupos de fêmeas em uso combinado de fármacos tanto em relação ao grupo controle quanto em relação a cada um dos fármacos utilizados em monoterapia.

As taxas de hemoglobina também foram afetadas, com redução tanto em machos quanto em fêmeas. A agomelatina, associada aos outros três fármacos do estudo, resultou, nas fêmeas, em menores taxas de hemoglobina quando comparada com seu uso isoladamente. Nos machos, a redução da taxa de hemoglobina ocorreu quando a agomelatina foi associada à sinvastatina, comparada com as taxas de ambos os fármacos usados em monoterapia, mesma combinação que impactou no número de eritrócitos e na redução do hematócrito nestes animais. Nos machos, nos grupos em combinações de fármacos e no grupo em polifarmácia, foi observada redução na taxa de hemoglobina quando comparados aos grupos em uso de cada fármaco em monoterapia.

Sengupta e colaboradores (2016), no estudo com os fármacos pioglitazona (hipoglicemiante oral) e telmisartan (anti-hipertensivo) demonstraram que ambos, em monoterapia e também em combinação, reduziram a contagem de hemoglobina e hemácias nos animais estudados, de modo dose dependente, mas não avaliaram a diferença entre sexos.

O achado mais relevante em relação aos índices hematimétricos diz respeito ao índice de anisocitose (RDW) nos machos, que se apresentou maior em quase todos os grupos tratados, quer em monoterapia, quer em combinação de fármacos, quando comparados ao grupo controle salina.

Assim, no eritrograma, observou-se anemia tanto em fêmeas quanto em machos. Porém, enquanto as fêmeas tiveram maior impacto no número de eritrócitos e no hematócrito, que foram reduzidos significativamente em todos os grupos em uso de associações de fármacos, os machos foram mais impactados em relação às taxas de hemoglobina, especialmente em uso de agomelatina+sinvastatina, e no índice de anisocitose, este encontrando-se aumentado em quase todos os grupos tratados com um ou mais fármacos.”

Bourneau-Martin e colaboradores (2017), relataram a ocorrência de trombocitopenia e de púrpura trombocitopênica em uma paciente fazendo uso de agomelatina. Mais recentemente, Yang e colaboradores (2019) demonstraram que a agomelatina em monoterapia reduziu a contagem de plaquetas em ratos *Sprague-Dawley* machos, mas não

tiveram nenhum efeito sobre as plaquetas das fêmeas. Estes estudos sinalizam que a agomelatina pode exercer alguma influência sobre o perfil de coagulação. No entanto, no presente trabalho, a agomelatina usada isoladamente não acarretou redução na contagem de plaquetas nos animais avaliados, independente do sexo. Em nosso estudo, verificamos plaquetopenia em animais fêmeas em uso de combinações de dois (agomelatina + sinvastatina; agomelatina + metformina), três (losartana + sinvastatina + metformina) ou quatro fármacos (agomelatina + losartana + sinvastatina + metformina), quando comparadas aos grupos em uso de sinvastatina ou de metformina utilizadas em monoterapia. Assim, a associação da agomelatina com estes fármacos aos pares levou à redução do número de plaquetas nas fêmeas em comparação às monoterapias, mas não em relação à agomelatina isoladamente. Embora este achado não tenha sido verificado nos animais machos, a comparação entre sexos revelou que os machos apresentaram contagem de plaquetas significativamente menor que as fêmeas nos grupos em uso de sinvastatina e de metformina. Assim, sinvastatina e metformina em monoterapia reduziu a contagem de plaquetas em animais machos, enquanto as fêmeas foram afetadas quando em uso de associações.

Assim, de modo geral, a maioria dos parâmetros hematológicos avaliados apresentou diferença significativa entre sexos em pelo menos um dos grupos de tratamento diante do uso dos fármacos do estudo.

Quanto às análises bioquímicas, vários parâmetros dos grupos estudados apresentaram diferenças entre sexos ou foram alterados mediante a presença da agomelatina.

Os machos apresentaram maiores taxas de colesterol e de triglicérides do que as fêmeas quando em uso da agomelatina isoladamente. As fêmeas, por sua vez, apresentaram maiores valores destas taxas do que os machos quando em uso de metformina em monoterapia.

O hipolipemiante sinvastatina não causou redução das taxas de colesterol total nem em machos, nem em fêmeas, estando os animais em condições normais de perfil lipídico, uma vez que, neste estudo, os animais não foram induzidos à hipercolesterolemia. No entanto, a sinvastatina reduziu as taxas de triglicérides em machos, quando comparados com os animais do grupo controle salina, mesmo em condições de normalidade do perfil lipídico, tendo sido os machos sensíveis à ação da sinvastatina sobre os triglicérides, mas não sobre o colesterol total.

Chamou-nos a atenção, porém, a maior taxa de triglicérides dos machos em uso de três fármacos (sinvastatina associada a losartana e a metformina) quando comparada com a taxa do grupo em uso de sinvastatina em monoterapia, o que pode sinalizar a possível interação entre estes três fármacos alterando o potencial da sinvastatina em atuar sobre os triglicérides nos animais machos. Como sinvastatina e losartana competem por duas enzimas do CYP450

(CYP2C9 e CYP3A4) em sua biotransformação, provavelmente a interação entre estes dois fármacos tenha resultado na diminuição da ação da sinvastatina sobre os triglicerídeos (SAITO *et al.*, 2005; SICA, GEHR, GHOSH, 2005).

A bilirrubina total, um dos parâmetros bioquímicos avaliados relacionados à função hepática, mostrou-se elevada nas fêmeas em grupos que fizeram uso de agomelatina associada tanto a losartana, quanto a sinvastatina e a metformina quando comparada a cada um dos fármacos em monoterapia, bem como em relação ao grupo controle salina, demonstrando que a agomelatina, ao ser associada a estes fármacos, aumentou a toxicidade hepática nas fêmeas. Este achado demonstra o potencial hepatotóxico da agomelatina, já descrito na literatura, que parece ter sido exacerbado em fêmeas quando este fármaco foi utilizado em combinação com os demais fármacos deste estudo (CARVALHO *et al.*, 2016; BILLIOTI DE GAGE *et al.*, 2018; SOUTO *et al.*, 2019).

Yang e colaboradores (2019), considerando a elevação da bilirrubina total como demonstração da hepatotoxicidade da agomelatina, verificaram o aumento bilirrubina total em ratos fêmeas em uso de agomelatina em monoterapia, também constatando a elevação deste parâmetro entre os animais machos. De modo distinto, nosso estudo não revelou elevação de bilirrubina total nos animais em uso isolado de agomelatina, mas apenas em fêmeas em uso da agomelatina combinada com outros fármacos, enquanto, nos machos, a associação da agomelatina com losartana ou com sinvastatina resultou em menores taxas de bilirrubina total quando comparadas com os fármacos isolados.

Na comparação entre sexos, a taxas de bilirrubina total das fêmeas dos grupos que utilizaram as combinações de agomelatina com losartana ou com sinvastatina foram superiores que as taxas dos machos dos mesmos grupos, demonstrando a maior susceptibilidade das fêmeas à hepatotoxicidade mediante estas combinações de fármacos.

Outro parâmetro relacionado à função hepática, a taxa de alanina aminotransferase (ALT), encontrou-se significativamente elevada no grupo de fêmeas em uso dos quatro fármacos, quando comparada com as taxas dos grupos em uso dos fármacos em monoterapia, bem como em comparação com as associações duplas ou tripla. A polifarmácia resultou, portanto, em sobrecarga da função hepática nas fêmeas. Yang e colaboradores (2019) verificaram que o uso de agomelatina em monoterapia causou elevação de ALT em ratos fêmeas e machos, o que não foi verificado em nosso estudo.

A fosfatase alcalina apresentou redução significativa entre as fêmeas de todos os grupos tratados em relação ao controle salina, exceto no grupo metformina. A fosfatase alcalina baixa está relacionada, dentre outros fatores, a condições patológicas que levam a anemia

severa; condição hematológica esta que se encontra presente entre as fêmeas deste estudo, demonstrando uma correlação entre as alterações observadas nos parâmetros hematológicos e bioquímicos destes animais (OOSTHUIZEN, 2011; BORONAT *et al.* 2017). Em uma investigação realizada por Yang e colaboradores (2019), animais fêmeas em uso de agomelatina em monoterapia apresentaram elevação de fosfatase alcalina, ao contrário do que verificamos. Porém, diferentemente do nosso estudo, os autores não detectaram anemia nos animais tratados.

Especificamente sobre a hepatotoxicidade da agomelatina, em seres humanos, o mecanismo subjacente à lesão hepática induzida por este fármaco parece ser idiossincrático (GAHR *et al.*, 2013). De acordo com Freiesleben e Furczyk (2015), o mecanismo de lesão pode ser hepatocelular, com aumento predominante da alanina aminotransferase (ALT); colestático, com predomínio da elevação de fosfatase alcalina; ou misto. No entanto, no presente estudo, não foi verificada elevação de ALT e de fosfatase alcalina nos animais em uso de agomelatina, exceto no grupo em que este fármaco foi associado aos três outros de modo concomitante, especialmente nos animais fêmeas.

Na comparação entre sexos, observou-se a inversão nas taxas de fosfatase alcalina nos machos e fêmeas em todos os grupos que receberam tratamentos em relação ao grupo controle não tratado, com redução significativa das taxas deste parâmetro nas fêmeas e elevação nos machos.

Os animais utilizados do presente estudo não foram induzidos à hiperglicemia, sendo todos normoglicêmicos. Ainda assim, nas fêmeas, foi observada redução no nível glicêmico em todos os grupos em relação ao grupo controle não tratado, sinalizando que os fármacos do estudo, exceto a metformina, em monoterapia ou associações, exerceram influência sobre o perfil glicêmico. Como exceção, nas fêmeas, que fizeram uso de metformina isoladamente não foi observada influência na glicemia. Embora seja um fármaco hipoglicemiante, a metformina não tem sido associada a hipoglicemia entre os indivíduos que a utilizam em condições de normoglicemia, sendo utilizada de modo *off label* para certas condições patológicas, a exemplo da síndrome dos ovários policísticos e para a obesidade e controle de peso (ZAROS, 2018).

Dentre as fêmeas, não foi observada alteração na glicemia naquelas em uso de agomelatina em monoterapia quando comparada com os grupos deste fármaco combinado com os demais. No entanto, verificou-se glicemia significativamente mais baixa em todos os grupos em uso de combinações quando comparados com os grupos que utilizaram losartana, sinvastatina ou metformina isoladamente. Ao contrário do que ocorreu nas fêmeas, os machos apresentaram elevação na glicemia, que se encontrou significativamente aumentada entre os

animais machos de todos os grupos que fizeram uso de algum tipo de associação de fármacos em relação ao grupo controle não tratado.

Na comparação entre os sexos, observou-se que a taxa de glicose das fêmeas, tanto do grupo controle quanto dos fármacos usados em monoterapia, mostrou-se maior que a dos machos; com a associação de drogas, todas as glicemias dos machos foram superiores às das fêmeas com diferença significativa entre os sexos nos grupos de fármacos combinados.

Na avaliação da função renal, observou-se que a associação da agomelatina com sinvastatina foi capaz de reduzir a taxa de ureia em relação ao grupo em uso da sinvastatina usada em monoterapia nos animais fêmeas, sugerindo a agomelatina como fator de proteção para a elevação de ureia em pacientes em uso de sinvastatina. Entre os machos, este achado não foi verificado, não havendo também diferença entre sexos nas taxas de ureia nos diversos grupos.

Os testes de função renal realizados por Yang e colaboradores (2019) em ratos tratados com agomelatina em monoterapia, mostraram que a agomelatina elevou a taxa de ureia nos animais machos e fêmeas. Diferentemente, no presente estudo, os animais em uso de agomelatina isoladamente não apresentaram elevação neste parâmetro bioquímico.

As taxas de creatinina, nas fêmeas, foram menores nos grupos em que a agomelatina foi utilizada em combinação pareada com cada um dos outros fármacos do estudo, quando comparadas com os fármacos utilizados isoladamente, inclusive em relação ao grupo controle e ao grupo em uso da própria agomelatina em monoterapia. A agomelatina, nestas condições de associação, parece ter um efeito protetor renal mediante a utilização dos fármacos individualmente. No entanto, a associação da agomelatina com os outros três fármacos de modo concomitante, culminou numa elevação significativa da taxa de creatinina quando comparada ao uso da agomelatina utilizada em monoterapia, sinalizando que, em condição de polifarmácia, a possível proteção renal da agomelatina não ocorreu.

Karaman e colaboradores (2016) investigaram, em ratos, o possível efeito nefroprotetor da agomelatina diante da condição de nefrotoxicidade induzida por contraste e, corroborando nossos achados, observaram que a administração de agomelatina juntamente com o contraste iohexol reduziu significativamente os níveis séricos de ureia e creatinina nos animais, atribuindo à agomelatina um possível efeito protetor renal por suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias nessa condição de associação.

Em um estudo em que a agomelatina foi utilizada em monoterapia em ratos, Yang e colaboradores (2019) verificaram que houve elevação de creatinina nos animais fêmeas, contrariando nossos achados, em que foi observada redução da creatinina no grupo de fêmeas

tratados com agomelatina em relação aos animais não tratados (controle salina). Başol e colaboradores (2016) demonstraram que a utilização da agomelatina em monoterapia em animais submetidos ao modelo de lesão renal induzida por sepse, resultou na redução de ureia e creatinina, além de melhores escores na avaliação histopatológica renal, sinalizando efeito nefroprotetor do fármaco.

Nas fêmeas, a associação dos quatro fármacos aumentou significativamente os níveis de creatinina em relação aos fármacos utilizados aos pares, sugerindo que a múltipla associação de fármacos pode desencadear maior susceptibilidade a danos renais nestes animais. Comparativamente, os machos apresentaram maiores taxas de creatinina do que as fêmeas nos grupos em uso da agomelatina em monoterapia e nos grupos em que a agomelatina foi associada a cada um dos fármacos aos pares.

A maioria dos estudos que avaliam a nefrotoxicidade realizados é baseada em modelos animais, havendo bem menos informações disponíveis em humanos. Embora os estudos em animais sejam razoavelmente bons preditores de efeitos renais adversos em humanos, há que se considerar importantes diferenças entre as espécies. Por exemplo: a influência dos hormônios sexuais, como a testosterona, em roedores, nos quais os hormônios têm papel na regulação do transporte renal e metabolismo de fármacos e outras substâncias. Assim, camundongos e ratos machos são geralmente mais sensíveis a lesão renal que as fêmeas a uma grande quantidade de substâncias químicas (TREVISAN *et al.*, 2012). Portanto, é imperativo otimizar a sensibilidade métodos *in vitro* para estudar a toxicidade de fármacos e outras substâncias sobre os órgãos humanos.

No âmbito geral, verificou-se que as fêmeas apresentaram alterações significativas em relação ao grupo controle salina em seis dos onze parâmetros bioquímicos analisados, demonstrando grande susceptibilidade das funções hepática e renal em relação aos fármacos utilizados. Os machos apresentaram alterações significativas em relação ao grupo controle salina apenas nos parâmetros triglicérides, especificamente no grupo sinvastatina, e glicose, que se encontrou alterada em todos os grupos em que as drogas foram utilizadas associadas em duas, três ou quatro combinações. Assim, os machos pareceram sofrer menos impactos nos parâmetros bioquímicos do que as fêmeas frente ao uso da agomelatina, losartana, sinvastatina e metformina.

As análises histopatológicas mostraram que, de um modo geral, fígado e rim foram os órgãos mais afetados nos animais deste estudo, chegando a apresentar lesão celular irreversível, com a ocorrência de necrose focal de hepatócitos e necrose tubular aguda (NTA), respectivamente, em alguns grupos. As fêmeas foram mais susceptíveis que os machos,

apresentando alterações histopatológicas em maior número de animais, além de mais severas, especialmente nestes órgãos, além de terem sido particularmente acometidas no baço, com alterações histopatológicas corroboradas por achados hematológicos. Já o intestino dos machos foi notadamente mais afetado que o das fêmeas, revelando alterações na arquitetura do órgão, com ocorrência de achatamento dos vilos e perda das criptas, bem como ocorrendo em número de animais superior às fêmeas.

As diferenças relacionadas ao sexo desempenham papel importante na toxicidade dos fármacos em vários órgãos, especialmente rim e fígado, tendo sido estudadas em animais e humanos (GOCHFELD, 2007; SABOLIC *et al.*, 2007; TREVISAN *et al.*, 2012). Em geral, ratos machos são mais sensíveis do que as fêmeas a danos renais causados por grande número de substâncias, incluindo fármacos, conforme apurado em extensa revisão realizada por Trevisan e colaboradores (2012). No entanto, em nosso trabalho, do ponto de vista histopatológicos, as fêmeas foram mais afetadas, especialmente quando em uso de metformina, manifestando toxicidade renal demonstrada pela presença marcante de inflamação e, também, a ocorrência de NTA. Quail e colaboradores (2010), em estudo sobre toxicidade e toxicocinética da metformina em uso subcrônico em ratos, precisaram eutanaziar precocemente alguns animais fêmeas, às quais atribuíram condição moribunda, por apresentarem evidentes e intensos sinais clínicos de toxicidade nas doses mais altas de metformina utilizadas (900 e 1200mg/kg/dia). Em nosso estudo, não foram observados sinais clínicos de toxicidade, nem houve mortalidade durante o tratamento, o que pode ser explicado pela dose administrada de 78,66mg/kg/dia, bem inferior do que aqueles autores utilizaram. Porém, ficou demonstrada a maior susceptibilidade renal das fêmeas à metformina quando foram realizadas as análises histopatológicas.

Em relação ao fígado, Gochfeld (2007) traz exemplos de estudos que demonstram maior susceptibilidade hepática dos animais fêmeas em relação aos machos a alguns xenobióticos, como o etanol, porém, não tendo sido verificado este achado em relação à cocaína, sugerindo uma dependência do tipo de substância utilizada nesta susceptibilidade. No entanto, o autor enfoca a limitação dos estudos com roedores, que empregam pequeno número de animais sendo, portanto, insuficientes em detectar as diferenças relacionadas ao sexo frente aos desafios experimentais, sendo esta também uma limitação do nosso estudo. Deste modo, seriam, necessários outros estudos experimentais com maior número de animais para demonstrar a influência do sexo na toxicidade da agomelatina, metformina, sinvastatina e losartana, isolados ou em associação nos diferentes órgãos.

O baço foi um órgão afetado de forma relevante, em particular nas fêmeas, tendo sido demonstrado a aumento da eritropoiese através do achado de grande número de megacariócitos em alguns grupos e, ao mesmo tempo, hemólise intensa, demonstrada pela presença acentuada de hemossiderófagos. Os achados histopatológicos esplênicos foram corroborados por hemograma que revelou anemia hemolítica nas fêmeas, nas quais foram observadas a redução do número de eritrócitos e hemoglobina, além da diminuição da taxa de hemoglobina verificada nos machos. A eritropoiese extramedular é um mecanismo fisiológico compensatório para reposição de eritrócitos quando a medula óssea não consegue suprir a demanda, podendo ocorrer em consequência de hemólise intensa, sendo o baço e o fígado os principais órgãos relacionados a esta produção de eritrócitos fora da MO, informação historicamente documentada na literatura (AMMUS & YUNIS, 1989).

A sinvastatina foi o fármaco usado em monoterapia mais relacionado a alterações histopatológicas discretas no fígado. De acordo com Björnsson (2017), em seres humanos, lesão hepática clinicamente importante devido ao uso das estatinas é muito rara, embora possa ocorrer hepatotoxicidade grave. Entre as estatinas, a sinvastatina, ao lado da atorvastatina, já foi associada com lesão hepática com desfecho fatal. Porém, o autor argumenta que se o paciente tem boa indicação para terapia com estatinas, mesmo aqueles com patologia hepática subjacente, como esteatohepatite não alcoólica, estes devem fazer uso do fármaco, pois muitos desses pacientes têm maior risco de mortalidade cardiovascular do que os que sofrem de doença hepática (SADIGHARA, 2017). No entanto, é preciso levar em conta que estes mesmos pacientes podem ainda ser afetados por outras comorbidades e, potencialmente, usar múltiplos medicamentos, sendo essencial a melhor compreensão do perfil de segurança, principalmente em relação à toxicidade hepática, para assegurar o correto uso da sinvastatina.

A agomelatina em monoterapia contribuiu para a ocorrência de alterações hepáticas nos animais, afetando particularmente os machos, com diminuição significativa do peso do órgão e a ocorrência de intensa inflamação em quase todos os animais do grupo G2/AGO, além de tumefação de hepatócitos e hiperplasia das células de Kupffer. Yang e colaboradores (2019) demonstraram, em ratos machos tratados com agomelatina isoladamente, o aumento no peso do fígado, contrariando nossos achados, em que os animais (machos e fêmeas) apresentaram redução do peso do fígado em relação ao grupo controle não tratado. Aqueles autores também descreveram lesões hepáticas nos animais de ambos os sexos, incluindo dilatação sinusoidal, deposição gordurosa e necrose de hepatócitos, causadas pelo uso da agomelatina em monoterapia. No presente estudo, as alterações histopatológicas hepáticas mais relevantes foram verificadas nas fêmeas, com inflamação intensa, esteatose microvesicular e necrose focal

de hepatócito, especialmente quando a agomelatina foi usada em associação, com sinvastatina ou com metformina, mas não em monoterapia.

Em recente revisão realizada por Souto e colaboradores (2019) sobre o uso da agomelatina em humanos, a hepatotoxicidade foi o efeito adverso mais citado e com maior relevância dentre os levantados. Também Carvalho e colaboradores (2016) apontam a hepatotoxicidade como importante efeito adverso da agomelatina em humanos, colocando-a ao lado de outros três antidepressivos (nefazodona, bupropiona e duloxetina) como principais fármacos desta classe relacionados a efeitos deletérios sobre o fígado. Deste modo, os achados do nosso estudo em animais, que sinalizam para uma susceptibilidade do fígado à agomelatina, confirmam a toxicidade hepática que vem sendo citada na literatura já no uso em humanos deste fármaco.

Ainda em relação ao uso da agomelatina em monoterapia, em importante estudo realizado por Yang e colaboradores (2019), o peso dos rins foi significativamente aumentado em ratos machos, além de terem sido detectados danos renais caracterizados principalmente por dilatação dos túbulos e um afinamento do córtex renal, não havendo diferença entre sexos. Diferentemente, no presente estudo, foi observada redução no peso dos rins dos animais machos em uso de agomelatina isoladamente, e os achados histopatológicos principais nestes animais foram moderada vacuolização do epitélio tubular e a presença de cilindros hialinos, ambos em reduzido número de animais do grupo em uso de agomelatina isoladamente.

Karaman e colaboradores (2016), ao testarem, em ratos, a agomelatina como possível nefropotetora na exposição ao contraste iohexol, verificaram nefrotoxicidade com a presença de cilindros hialinos e necrose tubular. Porém, constataram que os escores histopatológicos dos grupos em que a agomelatina foi associada, foram melhores do que naqueles grupos que não utilizaram a agomelatina, demonstrando a atenuação da nefrotoxicidade mediante uso combinado da agomelatina e seu potencial efeito protetor sobre a função renal.

O rim é um órgão-alvo frequente de compostos xenobióticos devido ao seu papel na filtração, secreção e reabsorção de substâncias. Uma grande quantidade de plasma sanguíneo é filtrada pelos rins todos os dias (cerca de 180L por dia) e aproximadamente 25% de todo o débito cardíaco vai para os rins, o que significa que estes órgãos são expostos ao excesso de potenciais substâncias tóxicas em comparação com outros órgãos. As diferenças relacionadas à atividade renal e susceptibilidade à nefrotoxicidade entre animais machos e fêmeas não dizem respeito ao número diferente de néfrons, que é semelhante entre os sexos, mas tem sido atribuídas à ação anabólica de andrógenos que induzem hipertrofia do túbulo proximal, tornando os machos mais sensível (TREVISAN *et al.*, 2012).

Vários mecanismos estão envolvidos em nefrotoxicidade decorrente do uso de fármacos e outras substâncias, como o acúmulo de xenobióticos e/ou seus metabólitos e a ativação destas substâncias *in situ*. Estresse oxidativo, apoptose e necrose aparecem como mecanismos comuns na lesão renal ocasionada por substâncias diversas, inclusive medicamentos (TREVISAN *et al.*, 2012).

No presente estudo, a metformina foi o fármaco com maior impacto renal quando usada isoladamente, levando à ocorrência de necrose tubular aguda em fêmeas e machos, embora em pequeno número de animais. Quaile e colaboradores (2010) realizaram extenso estudo sobre a toxicidade e toxicocinética da metformina em ratos, utilizando doses de 200 a 1200mg/kg/dia, também por um período de 90 dias (tratamento subcrônico), por gavagem. A dose de não efeito adverso observado (*no observable adverse effect level* - NOAEL) foi de 200mg/kg/dia, dose mais de duas vezes superior à que utilizamos em nosso estudo (78,66mg/kg/dia). Os autores detectaram a ocorrência de distúrbios metabólicos, sinais clínicos de toxicidade e mortalidade entre os animais, mas não realizaram análises histopatológicas nos rins que pudessem demonstrar acometimento renal. No entanto, verificaram o aumento do peso médio absoluto do rim em fêmeas em uso de 1200mg/kg de metformina por dia, bem como aumento do peso médio do órgão em relação ao peso corporal nas fêmeas tratadas com a dose de 600mg/kg. Ao contrário do que foi descrito por Quaile e colaboradores (2010), no presente estudo, foi observada redução do peso absoluto dos rins nas fêmeas tratadas com metformina, situação compatível com atrofia renal que se segue a condições tóxicas crônicas (ORR, BRIDGES, 2017).

A diferença no peso médio dos rins não foi observada entre os machos tanto no presente trabalho, quanto no estudo de Quaile e colaboradores (2010), o mesmo sendo verificado por Adaramoie e colaboradores (2012) que também não detectaram diferença nas médias de peso absoluto e relativo dos rins em machos tratados com metformina na dose de 30mg/kg/dia durante 21 dias, em relação ao controle.

É importante salientar que, em pacientes com função renal comprometida, a meia-vida plasmática de metformina encontra-se aumentada e a depuração renal diminuída, devendo, portanto, ser monitorada a função renal e/ou ser adequada a dose de metformina nestes pacientes, a fim de se evitar o risco aumentado de acidose láctica associada à metformina (*metformin-associated lactic acidosis* – MALA) (FILIPPATOS, 2017; SCHEEN, 2017).

Sinvastatina e losartan usados isoladamente foram fármacos em cujos grupos verificaram-se as principais alterações histopatológicas intestinais, especialmente nos machos, também estando associados à inflamação no estômago quando usados isolados ou em

associação. Özbakiş-Dengiz e colaboradores (2012) testaram o efeito de estatinas em modelo de lesão gástrica induzida por indometacina em ratos e verificaram que, embora a dose de 20mg/kg de sinvastatina tenha inibido a infiltração de leucócitos mononucleares, a dose de 40mg/kg induziu hiperemia. Os autores inclusive recomendam que o uso de estatinas em humanos seja feito com cautela em pacientes com desconforto gástrico. Em nosso estudo, a dose utilizada de sinvastatina foi de 1,83mg/kg e os achados relacionados à inflamação no estômago dos grupos que usaram o fármaco foram considerados leves, provavelmente pela dose reduzida.

Kim e colaboradores (2017), em um estudo de farmacovigilância realizado na Coreia do Sul, observaram que os distúrbios gastrintestinais foram os efeitos adversos mais comuns entre pacientes em uso de estatinas, incluindo sinvastatina, com manifestações que incluíam dor abdominal, constipação, gastrite e náusea, sinalizando potencial efeito da sinvastatina não apenas sobre o intestino, mas também no estômago, reforçando o cuidado no uso destes fármacos em pacientes com predisposição ao desenvolvimento de problemas gastrointestinais.

Eraslan e colaboradores (2020) realizaram estudo para avaliar os efeitos profiláticos da agomelatina na úlcera gástrica induzida por indometacina em ratos, analisando, dentre outros parâmetros, a ocorrência de alterações histopatológicas no estômago. Os autores verificaram que a agomelatina, quando utilizada na dose de 5mg/kg de peso, apresentou resultados protetores semelhantes ao omeprazol, um antissecretório gástrico comumente utilizado para o tratamento de úlcera péptica, sugerindo que a agomelatina pode apresentar um efeito de gastroproteção. Na avaliação histopatológica, verificaram menores danos epiteliais, ausência de edema, menores infiltrações linfocitárias e, também, menos hemorragia nos animais que foram induzidos à úlcera e utilizaram agomelatina. No presente estudo, verificamos processo inflamatório em todos os grupos de animais tratados, inclusive com agomelatina em monoterapia.

De acordo com Al-Majed e colaboradores (2015), em humanos, a losartana não apresenta efeitos metabólicos relevantes, sendo inclusive a função renal preservada mesmo em pacientes com insuficiência renal. Em nosso estudo, de fato, a losartana teve pouco impacto nos rins, não sendo verificado processo inflamatório em nenhum animal em uso de losartana em monoterapia, apenas sendo verificada a rara ocorrência de tumefação e vacuolização do epitélio tubular somente quando esta foi associada à agomelatina.

Ozmen e Topsakal (2020) analisaram os possíveis efeitos profiláticos da agomelatina sobre o pâncreas no modelo de sepse induzida por lipopolissacarídeo em ratos

Wistar albinos fêmeas. Segundo os autores, a agomelatina resultou em melhorias nos parâmetros bioquímicos, histopatológicos e imuno-histoquímicos relacionados ao pâncreas, quando comparados aos animais que não fizeram uso do fármaco. Nosso estudo não encontrou alterações histopatológicas no pâncreas dos animais em uso de agomelatina, sinalizando que, pelo menos, o fármaco utilizado individualmente parece não causar danos pancreáticos. No entanto, as associações dos múltiplos fármacos do presente estudo (losartana + metformina + sinvastatina e agomelatina + losartana + metformina + sinvastatina) acarretaram alguma toxicidade sobre o pâncreas. Embora os achados não tenham sido tão pronunciados, chamamos a atenção para a presença da sinvastatina nos grupos que sofreram alterações neste órgão. As estatinas, a exemplo da sinvastatina, têm sido associadas a alterações pancreáticas, com diminuição da produção de insulina e aumento do risco do desenvolvimento de diabetes mellitus, além da ocorrência de pancreatite aguda (KUOPPALA *et al.*, 2015; SADIGHARA *et al.*, 2017).

A sinvastatina isolada ou associada com múltiplos fármacos (com losartana + metformina e com agomelatina + losartana + metformina), também esteve presente nos grupos em que foi verificada presença de focos inflamatórios no coração, contrariando o possível efeito anti-inflamatório que lhe tem sido atribuído quando usada em monoterapia (LI *et al.*, 2013; ANDRES *et al.*, 2014). Propriedades anti-inflamatórias e vasoprotetoras da sinvastatina têm sido analisadas em condições associadas à inflamação sistêmica aguda, como endotoxemia, e em isquemia (PLEINER *et al.*, 2004). Deste modo, os efeitos benéficos da sinvastatina foram verificados frente a uma condição patológica preexistente e não em condições controladas como as adotadas em nosso estudo. Essa diferença de condições dificulta a comparação dos achados.

No coração, a associação da agomelatina com a metformina culminou na redução do número de animais machos com focos inflamatórios: no grupo em uso de metformina, foram detectados focos inflamatórios em 50% dos animais; quando do uso da associação agomelatina + metformina, nenhum dos animais apresentou focos inflamatórios.

O potencial efeito anti-inflamatório da agomelatina tem sido estudado em diferentes circunstâncias. Karaman e colaboradores (2016) demonstraram o efeito nefroprotetor, antioxidante e anti-inflamatório da agomelatina contra a nefrotoxicidade induzida por contraste. Em outro contexto, Ozcan e colaboradores (2019) investigaram a eficácia potencial do tratamento com agomelatina na prevenção de diabetes e encefalopatia, com foco no estresse oxidativo do tecido cerebral e processos inflamatórios, verificando que o tratamento com agomelatina parou a progressão da encefalopatia diabética em ratos e reverteu lesão neuronal induzida por glicose.

Mais recentemente, Asci e colaboradores (2020), avaliaram dano endotelial e cardíaco em ratos fêmeas *Wistar*, em modelo com uso de lipopolissacarídeo, e demonstraram que a agomelatina apresentou atividade anti-inflamatória, antioxidante e antiapoptótica melhorando parâmetros bioquímicos, histopatológicos e imuno-histoquímicos. Também Aygun e Gul (2019) analisaram o possível efeito protetor da agomelatina sobre a cardiotoxicidade induzida por doxirrubicina e verificaram que a agomelatina foi benéfica em vários parâmetros. Jia e colaboradores (2018), por sua vez descreveram o potencial protetor da agomelatina sobre o miocárdio no modelo de lesão por isquemia de reperfusão, quando usada previamente à lesão, melhorando significativamente a função cardíaca, atenuando alterações patológicas no miocárdio isquêmico, reduzindo o tamanho do infarto do miocárdio, dentre outras melhorias em parâmetros bioquímicos. Ao mesmo tempo, Mago e colaboradores (2014), avaliaram o perfil de toxicidade cardiovascular de vários antidepressivos e constataram que a agomelatina se encontrava entre aqueles que não apresentavam evidências de riscos cardiovasculares.

Deste modo, é possível que, em nosso trabalho, a associação da agomelatina tenha tido impacto na redução da inflamação em relação aos animais de nosso estudo que foram tratados apenas com metformina, não sendo a agomelatina cardiotóxica e apresentando um possível efeito protetor sobre o tecido cardíaco frente a metformina.

Do ponto de vista histopatológico, o presente estudo demonstrou que os medicamentos de uso crônico testados, quando usados em combinação (polifarmácia), culminaram em alterações importantes em vários órgãos, principalmente fígado, rins e baço. As fêmeas foram mais suscetíveis aos efeitos tóxicos induzidos pela combinação de drogas, apresentando alterações histopatológicas graves em um número maior de animais, bem como em diferentes órgãos, especialmente fígado, rins, estômago e baço. O pâncreas foi discretamente mais sensível quando na utilização de múltiplos fármacos (três ou quatro), igualmente em machos e fêmeas. Alterações cardíacas e intestinais foram mais observadas nos machos.

No presente estudo, a agomelatina esteve associada a danos graves no fígado, principalmente quando combinada com sinvastatina e metformina, bem como a alterações renais importantes, como necrose tubular aguda e atrofia do órgão. No entanto, a literatura nos traz à discussão a potencial ação protetora deste fármaco sobre alguns órgãos, como estômago, pâncreas, coração e rins, sugerindo um efeito anti-inflamatório e antioxidante que pode ser benéfico em situações diversas.

A atividade antidepressiva de um fármaco pode ser avaliada através de testes comportamentais, como o teste do nado forçado (DETKE, JOHNSON, LUCKI, 1997; LUCKI,

1997). A redução no tempo de imobilidade do animal e o aumento no tempo de nado no teste, refletem a eficácia da atividade antidepressiva de uma substância, a exemplo do que foi verificado por Canpolat e colaboradores (2016) em relação à agomelatina.

Em nosso trabalho, a avaliação da interferência dos fármacos utilizados sobre a atividade antidepressiva da agomelatina foi realizada através do teste do nado forçado, sendo este conduzido apenas na segunda etapa do estudo com animais machos, não havendo, portanto, parâmetro de comparação entre os sexos.

Verificou-se que o tempo de imobilidade dos animais machos foi significativamente maior no grupo em uso da associação agomelatina+metformina em relação ao grupo que utilizou agomelatina isoladamente, de modo que a metformina parece ter influenciado na redução da atividade antidepressiva da agomelatina.

Estudos farmacocinéticos demonstram que, em seres humanos, a metformina não sofre metabolismo hepático, sendo excretada inalterada pelas vias urinária e biliar (QUAILE, 2010; MARKOWICZ-PIASECKA, 2017). Porém, em *Rattus norvegicus* machos da linhagem *Sprague-Dawley*, a biotransformação hepática da metformina através das enzimas CYP foi descrita por Choi e colaboradores (2006a; 2006b, 2008), que demonstraram que o metabolismo do fármaco ocorre via CYP2C11, CYP2D1 e CYP3A1/2, mas não via CYP1A1/2, CYP2B1/2 e CYP2E1. O mesmo grupo de pesquisadores demonstrou que, em ratos *Sprague-Dawley* machos, o itraconazol e a metformina competem pela CYP3A1/2, culminando na interação entre fármacos (CHOI *et al.*, 2010). Mais recentemente, os autores demonstraram a competição da nifedipina e da metformina, pelos mesmos sistemas enzimáticos hepáticos em ratos machos, culminando em uma interação farmacocinética que tem como consequência a inibição do metabolismo hepático destes fármacos e, portanto, a maior biodisponibilidade e atividade dos mesmos (CHOI, LEE, 2012).

Assim, diferentemente do que é descrito para seres humanos até o presente momento, em ratos machos, o metabolismo hepático da metformina ocorre via enzimas do citocromo P450 (CYP), já tendo sido relatadas situações de competição entre fármacos pela mesma via metabólica nesta espécie animal. No entanto, não há dados na literatura que mostrem o potencial indutor enzimático da metformina sobre as CYPs relacionadas à biotransformação da agomelatina (CYP1A2, CYP2C9 e CYP2C19) situação que justificaria a diminuição da biodisponibilidade do antidepressivo e, conseqüentemente, a redução da atividade deste fármaco, como foi verificado em nosso estudo através do teste do nado forçado (DOLDER, NELSON, SNIDER, 2008; FREIESLEBEN, FURCZYK, 2015).

Deste modo, a interação metformina/agomelatina em ratos machos pode não estar relacionada à biotransformação dos fármacos. Algumas alternativas podem ser estudadas para elucidar se há outros tipos de interação farmacocinética entre estes fármacos e a influência da metformina sobre a atividade antidepressiva da agomelatina em ratos machos, tais como: verificar se a metformina reduz a absorção da agomelatina, ou se aumenta a afinidade da agomelatina pelas proteínas plasmáticas ou, ainda, se é capaz de acelerar a excreção do antidepressivo, situações que afetariam a biodisponibilidade da agomelatina e, conseqüentemente, sua atividade farmacológica.

Assim, embora o achado tenha sido bastante significativo ($p < 0,01$), não foi possível, através do presente estudo e da literatura atualmente disponível, explicar a influência da metformina na redução da atividade antidepressiva da agomelatina em ratos machos.

Através de uma busca na base de dados Medline, com o cruzamento dos descritores *metformin* e *agomelatine*, a literatura atual não nos apresenta estudos que demonstram os efeitos da associação metformina+agomelatina em condições de uso preconizadas para os dois fármacos (hipoglicemiante e antidepressivo, respectivamente). No entanto, a busca resultou no encontro de um trabalho realizado por Kast e colaboradores (2017), em que a metformina e a agomelatina foram utilizadas em associação com outros cinco fármacos, para o tratamento do câncer de mama metastático, com objetivos terapêuticos diversos àqueles para os quais os fármacos são prescritos. Portanto, não foi objetivo dos autores investigar o efeito das interações dos fármacos utilizados sobre a atividade antidepressiva da agomelatina.

Por fim, nossos achados histopatológicos, aliados aos resultados hematológicos e bioquímicos, trazem novas e relevantes informações sobre o perfil de segurança do antidepressivo agomelatina e suas combinações com importantes fármacos de uso crônico, podendo suscitar estudos futuros que investiguem os mecanismos relacionados aos efeitos tóxicos destes fármacos utilizados em polifarmácia e, também, aos potenciais efeitos protetores da agomelatina sugeridos na literatura. Também o resultado do teste do nado forçado sinaliza a necessidade de investigação de potenciais interações que podem ocorrer entre a agomelatina e outros fármacos podendo culminar na diminuição da atividade antidepressiva da mesma. Reforça-se, então, a necessidade da realização de pesquisas que procurem elucidar os mecanismos de interação entre estes fármacos, bem como as possíveis influências genéticas, para que possam ser utilizados com segurança e mantenham sua eficácia na condição de associações e de polifarmácia.

7 CONCLUSÃO

A agomelatina associada a losartana, sinvastatina e metformina alterou o perfil de segurança destes fármacos.

Nas análises hematológicas, as principais alterações decorrentes do uso dos fármacos agomelatina, losartana, sinvastatina e metformina, isolados ou em associações, foram verificadas no eritrograma. A maioria dos parâmetros hematológicos avaliados (nove de quinze) apresentou diferença significativa entre sexos em pelo menos um dos grupos de tratamento diante do uso dos fármacos do estudo. As fêmeas foram mais sensíveis que os machos ao uso concomitante de múltiplos fármacos em relação a alterações dos parâmetros hematológicos.

Os parâmetros bioquímicos relacionados às funções hepáticas e renal foram os mais afetados pelo uso dos fármacos agomelatina, losartana, sinvastatina e metformina, isolados ou e associações. As fêmeas apresentaram alterações significativas em relação ao grupo controle salina em seis dos onze parâmetros bioquímicos analisados, demonstrando grande susceptibilidade das funções hepática e renal em relação aos fármacos utilizados, mostrando-se mais sensíveis que os machos ao uso concomitante de múltiplos fármacos em relação a alterações dos parâmetros bioquímicos.

A agomelatina foi relacionada ao aumento do risco de alterações histopatológicas em machos e fêmeas quando associada aos fármacos estudados, especialmente no fígado, rins e baço. As fêmeas apresentaram alterações histopatológicas hepáticas mais intensas e mais severas do que os machos quando a agomelatina foi associada aos outros fármacos, especialmente sinvastatina e metformina. As fêmeas foram mais sensíveis a alterações histopatológicas renais e a atrofia renal do que os machos quando em uso de metformina em monoterapia ou associada a agomelatina. - O baço foi afetado de forma relevante ao uso dos fármacos do estudo, em monoterapia ou associados, em particular nas fêmeas.

Por fim, verificou-se que a atividade antidepressiva da agomelatina em ratos *Wistar* machos foi significativamente reduzida com o uso concomitante de metformina.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O conhecimento do potencial de interação de um fármaco é de grande valia para a prescrição racional, e pode ajudar os profissionais médicos a prever e, eventualmente, evitar certas combinações de medicamentos. Se o uso de fármacos com potencial de interação não puder ser evitado, as consequências clínicas podem e devem ser minimizadas pela prescrição de doses individualizadas e ajustes de dose guiados pelo monitoramento cuidadoso das respostas clínicas e da concentração plasmática dos fármacos.

8.1 Limitações do estudo

Um trabalho experimental e com animais é sempre acompanhado de muitos desafios que, muitas vezes, tornam-se limitações. Quanto a isto, não fugimos à regra. Dentre os principais desafios e limitações que encontramos, podemos citar o tempo para a execução do projeto e falta de recursos materiais e humanos para realização de análises hematológicas, bioquímicas e histopatológicas ainda mais completas em tempo hábil e que contemplassem na íntegra todas as recomendações da OECD, em que muitos outros testes hematológicos e bioquímicos deveriam ser realizados e tantos outros órgãos analisados.

Com um desenho experimental ousado, com muitos grupos experimentais já contando com um enorme número de animais, também não conseguimos seguir, na íntegra, a recomendação da OECD de utilizar 10 animais por grupo, o que aumentaria o trabalho em 80 animais, implicando em mais tempo e mão-de-obra para a execução do trabalho, além de mais gasto de recursos.

Uma outra lacuna que nosso estudo deixou foi a comparação entre sexos da atividade antidepressiva da agomelatina quando em associação com os fármacos avaliados, visto que somente na segunda etapa atentou-se para a realização do teste do nado forçado. Assim, apenas tivemos este parâmetro relativos aos animais machos. Deste modo, perdeu-se a oportunidade de se comparar os achados desta variável entre os sexos, o que poderia ter enriquecido ainda mais o trabalho.

8.2 Perspectivas futuras

O objetivo mais amplo e geral de uma pesquisa científica é elucidar partes de um problema levantado e suscitar novas dúvidas para que a ciência prossiga em busca de mais respostas.

Assim, a partir dos conhecimentos adquiridos neste trabalho, novas problemáticas são aqui levantadas, propondo-se como perspectivas futuras:

1) a realização de estudos para a elucidação dos mecanismos de interação e de toxicidade relacionados às associações dos fármacos estudados;

2) a avaliação da neurotoxicidade das associações estudadas.

REFERÊNCIAS

ADARAMOYE, Oluwatosin *et al.* Evaluation of toxic effects of metformin hydrochloride and glibenclamide on some organs of male rats. **Nigerian Journal of Physiological Sciences**, Ibadan, v. 27, n. 2, p.137-144, 2012. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23652227/?from_single_result=Evaluation+of+toxic+effects+of+metformin+hydrochloride+and+glibenclamide+on+some+organs+of+male+rats. Acesso em: 12 fev. 2020.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC N° 277, de 16 de abril de 2019**. Brasília, DF. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2019/rdc0277_16_04_2019.pdf Acesso em: 12 fev. 2020.

AGOMELATINE. Disponível em: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB06594> Acesso em: 12 fev. 2020.

AL-MAJED, Abdul-Rahman A. *et al.* Losartan: comprehensive profile. **Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology**, Nova York, v. 40, p. 159-194, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1871512515000084?via%3Dihub>. Acesso em: 22 abr. 2019.

ALMEIDA, Silvana Maria de; GAMA, Cinthia Scatena; AKAMINE, Nelson. Prevalência e classificação de interações entre medicamentos dispensados para pacientes em terapia intensiva. **Einstein**, São Paulo, v. 5, n. 4, p. 347-351, 2007. Disponível em: [http://apps.einstein.br/revista/arquivos/PDF/672-Einstein_OnLineTraduzida_Vol.5\(4\)_Miolo_P%C3%A1g.347%20a%20351.pdf](http://apps.einstein.br/revista/arquivos/PDF/672-Einstein_OnLineTraduzida_Vol.5(4)_Miolo_P%C3%A1g.347%20a%20351.pdf). Acesso em: 2 out. 2019.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais: DSM-5. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

AMMUS, S.; YUNIS, A. Drug-induced red cell dyscrasias. **Blood Reviews**, Nova York, v. 3, n. 2, p. 71-82, 1989. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0268960X89900015?via%3Dihub>. Acesso em: 18 out. 2019.

ANDERSON, Gail D. Gender differences in pharmacological response. **International Review of Neurobiology**. Amsterdam, v. 83, p. 1-10, 2008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0074774208000019?via%3Dihub>. Acesso em: 25 fev. 2020.

ANDRES, Allen. M. *et al.* Mitophagy is required for acute cardioprotection by simvastatin. **Antioxidants & Redox Signaling**, Nova York, v. 21, n. 14, p. 1960-1973, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4208607/pdf/ars.2013.5416.pdf>. Acesso em: 19 ago. 2019.

ASCI, H *et al.* Agomelatine protects heart and aorta against lipopolysaccharide-induced cardiovascular toxicity via inhibition of NF- κ B phosphorylation. **Drug Chemical Toxicology**,

Abingdon, 2020. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01480545.2019.1663209>. Acesso em: 12 mar. 2020.

AYGUN, H.; GUL, S. S. Cardioprotective effect of melatonin and agomelatine on doxorubicin-induced cardiotoxicity in a rat model: an electrocardiographic, scintigraphic and biochemical study. **Bratislaviske Lekarske Listy**, Bratislava, v. 120, n. 4, p. 249-255, 2019. Disponível em: http://www.elis.sk/download_file.php?product_id=6110&session_id=j2mrcto1s1llasjs4677vgtsn6. Acesso em 20 mar. 2020.

BILLIOTI DE GAGE, S. *et al.*, Antidepressants and hepatotoxicity: a cohort study among 5 million individuals registered in the French National Health Insurance Database. **CNS Drugs**, Nova York, v. 32, n. 7, p. 673-84, 2018. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6061298/pdf/40263_2018_Article_537.pdf. Acesso em: 3 abr. 2019.

BJÖRNSSON, Einar.S. Hepatotoxicity of statins and other lipid - lowering agents. **Liver International**, Hoboken, v. 37, p. 173-178, 2017. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/liv.13308>. Acesso em: 3 abr. 2019.

BORONAT, Mauro *et al.* Relationship between anemia and serum concentrations of calcium and phosphorus in advanced non-dialysis-dependent chronic kidney disease. **Nephron**, Basileia, v. 135, n. 2, p. 97-104, 2017. Disponível em: <https://www.karger.com/Article/Abstract/450892>. Acesso em 22 mar. 2020.

BOURNEAU-MARTIN, Delphine *et al.* Agomelatine-induced thrombocytopenic purpura, a possible new adverse effect. **Thérapie**, Paris, v. 72, n. 3, p. 401-402, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004059571631263X?via%3Dihub>. Acesso em: 14 mar. 2019.

BRAZ, Cyntia de Lima *et al.* Medicamentos com atividade sobre o citocromo P450 utilizados por idosos em domicílio. **Revista Médica de Minas Gerais**, Belo Horizonte, v. 28, p. e-1927, 2018. Disponível em: http://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/12/967878/medicamentos-com-atividade-sobre-o-citocromo-p450-utilizados-po_gp2WMCT.pdf. Acesso em 20 mar. 2020.

CADOGAN, Cathal A.; RYAN, Cristín; HUGHES, Carmel M. Appropriate polypharmacy and medicine safety: when many is not too many. **Drug Safety**, Amsterdã, v. 39, n. 2, p.109-116, 2016. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4735229/pdf/40264_2015_Article_378.pdf. Acesso em: Acesso em: 3 abr. 2019.

CANPOLAT, Sinan *et al.* Studies on the reproductive effects of chronic treatment with agomelatine in the rat. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdã, v. 770, p. 33-39, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0014299915303903?via%3Dihub>. Acesso em: 14 mar. 2020.

CARVALHO, André F. *et al.* The Safety, tolerability and risks associated with the use of newer generation antidepressant drugs: a critical review of the literature. **Psychotherapy and**

Psychosomatics, Basileia, v. 85, n. 5, p. 270-288, 2016. Disponível em: <https://www.karger.com/Article/FullText/447034>. Acesso em: 5 mai. 2019.

CHAVES FILHO, Adriano José Maia *et al.* IDO chronic immune activation and tryptophan metabolic pathway: A potential pathophysiological link between depression and obesity. **Progress in Neuro- Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, Amsterdã, v. 80, p. 234-249, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0278584616303451?via%3Dihub>. Acesso em: 5 mai. 2019.

CHOI, Y. H. *et al.* Pharmacokinetic interaction between itraconazole and metformin in rats: Competitive inhibition of metabolism of each drug by each other via hepatic and intestinal CYP3A1/2. **British Journal of Pharmacol**, Berlim, v. 161, n. 4, p. 815-829, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2992897/pdf/bph0161-0815.pdf> Acesso em: 7 mai. 2019.

CHOI, Y. H.; CHUNG, S. J.; LEE, M. G. Pharmacokinetic interaction between DA-8159, a new erectogenic, and metformin in rats: competitive inhibition of metabolism via hepatic CYP3A1/2. **British Journal of Pharmacol**, Berlim, v. 153, n. 7, p. 1568-1578, 2008. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2437910/pdf/0707680a.pdf>. Acesso em: 7 mai. 2019.

CHOI, Y. H.; KIM, S. G.; LEE, M. G. Dose-independent pharmacokinetics of metformin in rats: Hepatic and gastrointestinal first-pass effects. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdã, v. 95, n. 11, p. 2543-2552, 2006b. Disponível em: [https://jpharmsci.org/article/S0022-3549\(16\)32119-0/pdf](https://jpharmsci.org/article/S0022-3549(16)32119-0/pdf) Acesso em: 7 mai. 2019.

CHOI, Y. H.; LEE, M. G. Effects of enzyme inducers and inhibitors on the pharmacokinetics of metformin in rats: Involvement of CYP2C11, 2D1 and 3A1/2 for the metabolism of metformin. **British Journal of Pharmacol**, Berlim, v. 149, n. 4, p. 424-430, 2006a. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1978432/pdf/0706875a.pdf> . Acesso em: 7 mai. 2019.

CHOI, Young H.; LEE, Myung G. Pharmacokinetic and pharmacodynamic interaction between nifedipine and metformin in rats: competitive inhibition for metabolism of nifedipine and metformin by each other via CYP isozymes. **Xenobiotica**, Abingdon, v. 42, n. 5, p 483-495, 2012. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/00498254.2011.633177>. Acesso em: 7 mai. 2019.

CRUCIOL-SOUZA, Joice Mara.; THOMSON, João Carlos. Prevalence of potential drug-drug interactions and its associated factors in a Brazilian teaching hospital. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, Alberta, v. 9, n. 3, p. 427-433, 2006. Disponível em: https://sites.ualberta.ca/~csps/JPPS9_3/MS_632/MS_632.html. Acesso em: 2 out. 2019.

DETKE, Michael J.; JOHNSON, Jennie; LUCKI, Irwin. Acute and chronic antidepressant drug treatment in the rat forced swimming test model of depression. **Experimental and Clinical Psychopharmacology**, Northeast Wahsington, v. 5, n. 2, p. 107-112, 1997. Disponível em: <https://psycnet.apa.org/record/1997-06207-002>. Acesso em: 2 de fev. 2018.

DOLDER, Christian R.; NELSON, Michael; SNIDER, Morgan. Agomelatine treatment of major depressive disorder. **The Annals of Pharmacotherapy**, Thousand Oaks, v. 42, n. 12, 1822-1831, 2008. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1345/aph.1L296>. Acesso em: 2 out. 2019.

ERASLAN, Ersen *et al.* Agomelatine prevents indomethacin-induced gastric ulcer in rats **Pharmacological Reports**, Berlim, 2020. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs43440-019-00049-2>. Acesso em: 21 mar., 2020.

FILIPPATOS, Theodosius *et al.* Acid-base and electrolyte disorders associated with the use of antidiabetic drugs. **Expert Opinion on Drug Safety**, Abingdon, v. 16, n. 10, p. 1121-1132, 2017. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14740338.2017.1361400>. Acesso em 7 mai. 2019.

FREIESLEBEN, Silka Dawn; FURCZYK, Karolina. A systematic review of agomelatine-induced liver injury. **Journal of Molecular Psychiatry**, Londres, v. 3, n. 4, 2015. Disponível em: <https://jmolcularpsychiatry.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40303-015-0011-7>. Acesso em: 25 fev. 2020.

GAHR, M. *et al.* Agomelatine and hepatotoxicity: implications of cumulated data derived from spontaneous reports of adverse drug reactions. **Pharmacopsychiatry**, Nova York, v. 46, n. 6, p. 214-220, 2013. Disponível em: <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/s-0033-1353156>. Acesso em: 12 out. 2019.

GOCHFELD, Michael Framework for gender differences in human and animal toxicology. **Environmental Research**, Amsterdã, v. 104, n. 1, p. 4-21, 2007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0013935105001945>. Acesso em 7 mai. 2019.

GOODWIN, Guy M *et al.* Agomelatine prevents relapse in patients with major depressive disorders without an evidence of a discontinuation syndrome: A 24h-week randomized, double-blind, placebocontrolled trial. **Journal of Clinical Psychiatry**, Memphis, v. 70, n. 8, p. 1128-1137, 2009. Disponível em: <https://www.psychiatrist.com/jcp/article/pages/2009/v70n08/v70n0808.aspx>. Acesso em: 29 jun. 2019.

GRUZ F. *et al.* Agomelatine: fulminante liver failure in a patient with fatty liver. **Gastroenterologia y Hepatologia**, Amsterdã, v. 37, n. 2, p. 92-94, 2014. Disponível em: <https://www.elsevier.es/es-revista-gastroenterologia-hepatologia-14-linkresolver-agomelatina-fallo-hepatico-fulminante-paciente-S0210570513001520>. Acesso em: 23 mar. 2019.

HUGHES, Lloyd D; McMURDO, Marion E. T.; GUTHRIE, Bruce. Guidelines for people not for diseases: the challenges of applying UK clinical guidelines to people with multimorbidity. **Age and Ageing**. Oxford, v. 42, n. 1, p. 62-69, 2013. Disponível em: <https://academic.oup.com/ageing/article/42/1/62/25375>. Acesso em: 15 abr. 2018.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2017. Número de idosos cresce 18% em 5 anos e ultrapassa 30 milhões em 2017. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/20980-numero-de-idosos-cresce-18-em-5-anos-e-ultrapassa-30-milhoes-em-2017>. Acesso em: 29 jun. 2019.

JIA, Pengyu, *et al.* Agomelatine protects against myocardial ischemia reperfusion injury by inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening. **American Journal of Translational Research**, Madison, v. 10, n. 5, p. 1310-1323, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5992559/pdf/ajtr0010-1310.pdf>. Acesso em 19 mar. 2020.

JUURLINK, David N. *et al.* Drug–drug interactions among elderly patients hospitalized for drug toxicity. **JAMA**, Chicago, v. 289, n. 13, p. :1652-1658, 2003. Disponível em: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/196302>. Acesso em: 12 abr. 2018.

KARAMAN, Adem *et al.* A novel approach to contrast-induced nephrotoxicity: The melatonergic agent agomelatine. **British Journal of Radiology**. Londres, v. 89, n. 1061, p. 20150716, 2016. Disponível em: <https://www.birpublications.org/doi/full/10.1259/bjr.20150716>. Acesso em 5 mai. 2019.

KAST, Richard E. *et al.* The ABC7 regimen: a new approach to metastatic breast cancer using seven common drugs to inhibit epithelial-to-mesenchymal transition and augment capecitabine efficacy. **Breast Cancer**, Macclesfield, v. 9, p. 495-514, 2017. Disponível em: <https://www.dovepress.com/the-abc7-regimen-a-new-approach-to-metastatic-breast-cancer-using-seve-peer-reviewed-article-BCTT>. Acesso em: 18 mar. 2020.

KIM, Hyunah. *et al.* analysis of national pharmacovigilance data associated with statin use in Korea. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, Abingdon, v. 121, p. 409-413. 2017. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/bcpt.12808>. Acesso em: 9 mai. 2019.

KIM, Jennifer; PARISH, Abby Luck. Polypharmacy and medication management in older adults. **The Nursing Clinics North America**, Amsterdã, v. 52, n. 3, p. 457-468, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0029646517300580?via%3Dihub> Acesso em: 5 fev. 2019.

KUOPPALA, Jaana *et al.* Use of statins and the risk of acute pancreatitis: A populationbased case-control study. **Pharmacoepidemiology and Drug Safety**, Abingdon, v. 24, n. 10, p. 1085-1092. 2015. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/bcpt.12808>. Acesso em: 9 mai. 2019.

LEENDERTSE, Anne J. *et al.* Frequency of and risk factors for preventable medication-related hospital admissions in the Netherlands. **Archives of Internal Medicine**, Chicago, v. 168, n. 17, p. 1890-1896, 2008. Disponível em: <https://jamanetwork.com/journals/jamainternalmedicine/fullarticle/414486>. Acesso em: 15 abr. 2018.

LI, Xiang-Dong *et al.* The cardioprotection of simvastatin in reperfused swine hearts relates to the inhibition of myocardial edema by modulating aquaporins via the PKA pathway.

International Journal of Cardiology, Amsterdã, v. 167, n. 6, p. 2657-2666, 2013. Disponível em: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167-5273\(12\)00912-6](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167-5273(12)00912-6). Acesso em: 9 mai. 2019.

LOSARTAN. Disponível em: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00678>. Acesso em: 12 fev. 2020.

LUCKI, I. The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. **Behavioural Pharmacology**, Bethesda v. 8, n. 6-7, p. 523-532, 1997. Disponível em: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00008877-199711000-00010>. Acesso em: 2 de fev. 2018.

MACHADO-ALBA, José Enrique *et al.*, Deprescribing: a new goal focused on the patient. **Expert Opinion on Drug Safety**, Abingdon, v. 16, n. 2, 2017. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14740338.2017.1273347>. Acesso em 5 mai. 2019.

MAGO Rajnish; TRIPATHI, Neeta; ANDRADE, Chittaranjan. Cardiovascular adverse effects of newer antidepressants. **Expert Review of Neurotherapeutics**, Abingdon, v. 14, n. 5, p. 539-551, 2014. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/14737175.2014.908709>. Acesso em: 13 mar. 2020.

MARAZZITI, Donatella *et al.* Pharmacokinetics and pharmacodynamics of psychotropic drugs: effect of sex. **CNS Spectrums**, Cambridge, v. 18, n. 3, p. 118-127, 2013. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/cns-spectrums/article/pharmacokinetics-and-pharmacodynamics-of-psychotropic-drugs-effect-of-sex/603E7AA80D28FFD2A7A6E758478017EC>. Acesso em: 4 mai. 2019.

MARKOWICZ-PIASECKA, Magdalena *et al.* Is metformin a perfect drug? Updates in pharmacokinetics and pharmacodynamics. **Current Pharmaceutical Design**, Sharjah, v. 23, n. 17, p. 2532-2550, 2016. Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/147864/article>. Acesso em: 4 mai. 2019.

McGRATH, Kathryn *et al.* Deprescribing: A simple method for reducing polypharmacy. **The Journal of Family Practice**, v. 66, n. 7, p. 436-445, 2017. Disponível em: <https://mdedge-files-live.s3.us-east-2.amazonaws.com/files/s3fs-public/Document/June-2017/JFP06607436.PDF>. Acesso em: 29 jun. 2019.

METFORMIN. Disponível em: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00331>. Acesso em: 12 fev. 2020

MILLAN, Mark John. Serotonin 5-HT_{2C} receptors as a target for the treatment of depressive and anxious states: focus on novel therapeutic strategies. **Thérapie**, Paris, v. 60, n. 5, p. 441-460, 2005. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040595716303262>. Acesso em: 11 mar. 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais – RENAME 2018**. Brasília, DF. Disponível em:

http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/medicamentos_rename.pdf. Acesso em: 2 fev. 2019.

MONTEJO, Angel. *et al.* The effects of agomelatine on sexual function in depressed patients and healthy volunteers. **Human Psychopharmacology**, Hoboken, v. 26, n. 8, p., 537-542, 2011. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/hup.1243>. Acesso em: 9 mai. 2019.

MONTGOMERY, S.A. *et al.* Absence of discontinuation symptoms with agomelatine and occurrence of discontinuation symptoms with paroxetine: a randomized, double-blind, placebocontrolled discontinuation study. **International Clinical Psychopharmacology**. v. 19, n. 5, p. 271-280, 2004. Disponível em: https://journals.lww.com/intclinpsychopharm/Abstract/2004/09000/Absence_of_discontinuati_on_symptoms_with.2.aspx. Acesso em: 9 mai. 2019.

NAIR, Anroop B.; JACOB, Shery. A simple guide for dose conversion between animals and human. **Journal of Basic and Clinical Pharmacy**, Windsor, v. 7, n. 2, p. 27-31, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4804402/pdf/JBCP-7-27.pdf>. Acesso em: 11 mar. 2018.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Guide for the care and use of laboratory animals. 8th ed.** Washington: The National Academies Press; 2011. Disponível em: <http://oacu.od.nih.gov/regs/guide/guide.pdf>. Acesso em 15 abr. 2018.

OBACH, R. Scott. Drug-drug interactions: an important negative attribute in drugs. **Drugs of Today**, Barcelona v. 39, n. 5, p. 301-338, 2003. Disponível em: https://journals.prous.com/journals/servlet/xmlxsl/pk_journals.xml_summaryn_pr?p_JournalId=4&p_RefId=799456. Acesso em: 11 mar. 2018.

OOSTHUIZEN, Nicholette M. Undetectable serum alkaline phosphatase activity in a patient with fulminant hepatic failure and hemolytic anemia. **Clinical Chemistry**. Oxford, v. 57, n. 3, p. 382-385, 2011. Disponível em: <https://academic.oup.com/clinchem/article/57/3/382/5621045>. Acesso em 20 mar. 2020.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **OECD guideline for the testing of chemicals, Section 4. Test No. 408: Repeated dose 90-day oral toxicity study in rodents.** Disponível em https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-408-repeated-dose-90-day-oral-toxicity-study-in-rodents_9789264070707-en. Acesso em: 8 ago, 2018.

ORR, Sarah E.; BRIDGES, Christy C. Chronic Kidney Disease and Exposure to Nephrotoxic Metals. **International Journal of Molecular Sciences**, Basileira, v. 18, n. 5, p. 1039, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5454951/pdf/ijms-18-01039.pdf>. Acesso em 23 mar. 2020.

ORTIZ, A. L. Sosa; GARCÍA, C. I. Astudillo; CASTILLO, G. I. Acosta. Determinants associated with chronic and incident depression in Mexican older adults. **Gaceta Médica de México**, Cidade do México, v. 153, n. 2, p. 102-118, 2017. Disponível em: http://gacetamedicademexico.com/files/gmm_153_2017_s2_102-118.pdf. Acesso em: 12 abr. 2018.

OSTERHOUDT, Kevin C.; PENNING, Trevor M. Drug Toxicity and Poisoning, *In*: BRUNTON, Laurence; CHABNER, Bruce; KNOLLMAN, Bjorn. **Goodman & Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 12th ed., New York: McGraw-Hill, 2012. p. 73-87.

ÖZBAKIŞ-DENGİZ, Günnur *et al.* Effects of statins in na indomethacin-induced gastric injury model in rats. **The Turkish Journal of Gastroenterology**, Ankara, v. 23, n. 5, p. 456-462, 2012. Disponível em: <https://www.turkjgastroenterol.org/eng/makale/2889/207/Full-Text>. Acesso em: 9 mai. 2019.

OZCAN, Mete *et al.* Agomelatine pretreatment prevents development of hyperglycemia and hypoinsulinemia in streptozotocin-induced diabetes in mice. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, Hoboken, v. 33, n. 2, p. 170-180, 2019. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/fcp.12413>. Acesso em: 9 mai. 2019.

OZMEN, Ozlen; TOPSAKAL, Senay. Preventive effect of agomelatine in lipopolysaccharide-induced pancreatic pathology. **Drug Chemical Toxicology**, Abingdon, 2020. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01480545.2019.1675686>. Acesso em: 22 mar. 2020.

PAGE, Amy T. *et al.* Polypharmacy among older Australians, 2006-2017: a population-based study. **The Medical Journal of Australia**, Hoboken, v. 211, n. 2, p. 71-75, 2019. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.5694/mja2.50244>. Acesso em: 16 out. 2019.

PLEINER, Johannes *et al.* Simvastatin prevents vascular hyporeactivity during inflammation. **Circulation**, Dallas, 110, n. 21, p. 3349-3354, 2004. Disponível em: <https://www.ahajournals.org/doi/epub/10.1161/01.CIR.0000147774.90396.ED>. Acesso em: 13 out. 2019.

QUAILE, Michael P. *et al.* Toxicity and toxicokinetics of metformin in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, Amsterdã, v. 243, n. 3, p. 340-347, 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X09004992?via%3Dihub>. Acesso em: 15 jun. 2019.

RIVERA, Suzanne M.; GILMAN, Alfred Goodman. Drug invention and the pharmaceutical industry. *In*: BRUNTON, Laurence; CHABNER, Bruce; KNOLLMAN, Bjorn. **Goodman & Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 12th ed., New York: McGraw-Hill, 2012. p. 3-16.

SABOLIĆ, Ivan. *et al.* Gender differences in kidney function. **Pflugers Archiv: European Journal of Physiology**, Berlim, v. 455, n. 3, p. 397-429, 2007. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00424-007-0308-1>. Acesso em: 13 out. 2019.

SADIGHARA, Melina *et al.* Toxicity of atorvastatin on pancreas mitochondria: a justification for increased risk of diabetes mellitus. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, Abingdon, v. 120, p. 131-137, 2017. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/bcpt.12656>. Acesso em: 13 out. 2019.

SAITO, M. *et al.* A literature search on pharmacokinetic drug interactions of statins and analysis of how such interactions are reflected in package inserts in Japan. **Journal of Clinical**

Pharmacy and Therapeutics, Hoboken, v. 30, n. 1, p. 21-37, 2005. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1365-2710.2004.00605.x>. Acesso em: 15 mar. 2018.

SAIZ-RODRÍGUEZ, Miriam *et al.* Polymorphisms in CYP1A2, CYP2C9 and ABCB1 affect agomelatine pharmacokinetics. **Journal of Psychopharmacology**, Thousand Oaks, v. 3, n. 4, 2019. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0269881119827959>. Acesso em: 9 mai. 2019.

SANSONE, Randy A.; SANSONE, Lori A. Agomelatine: a novel antidepressant. **Innovations in Clinical Neuroscience**, Bethesda, v. 8, n. 11, p. 10-14, 2011. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3244295/pdf/icns_8_11_10.pdf. Acesso em: 12 abr. 2018.

SAPETTI, Adrian. Agomelatine: An antidepressant without deterioration of sexual response. **Journal of Sex & Marital Therapy**, Abingdon, v. 38, n. 2, p. 190-197, 2012. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/0092623X.2011.613095>. Acesso em: 13 out. 2019.

SCHEEN, André J. Pharmacological management of type 2 diabetes: what's new in 2017? **Expert Review of Clinical Pharmacology**, Abingdon, v. 10, n. 12, p. 1383-1394, 2017. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/17512433.2017.1376652> Acesso em: 9 mai. 2019.

SENGUPTA, Pinaki *et al.* Safety profiling of pioglitazone and telmisartan combination by sub-chronic toxicity study in rat. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, Amsterdã, v. 81, p. 155-161, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0273230016302306?via%3DIhub>. Acesso em 19 fev. 2020.

SICA, Domenic A.; GEHR, Todd W. B.; GHOSH, Siddhatra. Clinical pharmacokinetics of losartan. **Clinical Pharmacokinetics**, Berlim, v. 44, n. 8, p. 794-814, 2005. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.2165%2F00003088-200544080-00003>. Acesso em: 13 out. 2019.

SIMVASTATIN. Disponível em: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00641>. Acesso em: 12 fev. 2020.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial, **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, Rio de Janeiro, v. 107, n. 3, 2017. Disponível em: http://publicacoes.cardiol.br/2014/diretrizes/2016/05_HIPERTENSAO_ARTERIAL.pdf. Acesso em: 12 dez. 2019.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes Sociedade Brasileira de Diabetes 2019-2020**. São Paulo: Clannad Editora Científica. Disponível em: <https://www.diabetes.org.br/profissionais/images/DIRETRIZES-COMPLETA-2019-2020.pdf>. Acesso em 21 mar. 2020.

SONG, L. *et al.* Effect of CYP1A2 polymorphism on the pharmacokinetics of agomelatine in Chinese healthy male volunteers. **Pharmacogenetics**, Hoboken, v. 39, n. 2, p. 204-209. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/jcpt.12118>. Acesso em: 5 fev. 2019.

SOUMIER, Amélie. *et al.* Mechanisms contributing to the phase-dependent regulation of neurogenesis by the novel antidepressant, agomelatine, in the adult rat hippocampus. **Neuropsychopharmacology**, Berlim, v. 34, n. 11, p. 2390-2403, 2009. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/npp200972>. Acesso em: 13 out. 2019.

SOUTO, Nara Ingrid Lima *et al.* Efeitos adversos e perfil de segurança da agomelatina – literatura científica *versus* bula do medicamento. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 1. p. 3139-3151. Disponível em: <http://www.rbfarma.org.br/files/Revista-RBF---Volume-100---N1---2019---V2.pdf>. Acesso em: 5 fev. 2019.

SPINA, Edoardo; TRIFIRÒ, Gianluca; CARACI Filippo. Clinically significant drug interactions with newer antidepressants. **CNS Drugs**. Berlim, v. 26, n. 1, p.39-67, 2012. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.2165%2F11594710-000000000-00000>. Acesso em: 5 fev. 2019.

STUHEC, Matej. Agomelatine-induced hepatotoxicity. **Wiener Klinische Wochenschrift**, Nova York, v. 125, p. 225-226, 2013. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00508-013-0344-0>. Acesso em: 28 mar. 2019.

TANNENBAUM, Cara; SHEEHAN, Nancy L. Understanding and preventing drug-drug and drug-gene interactions. **Expert Review of Clinical Pharmacology**. v. 7, n. 4, p. 533-544, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4894065/pdf/ierj-7-533.pdf>. Acesso em: 12 out. 2019.

TODD, Peter A.; GOA, Karen L. Simvastatin. A review of its pharmacological properties and therapeutic potential in hypercholesterolemia. **Drugs**, Nova York, v. 40, n. 4, p. 583-607, 1990. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.2165%2F00003495-199040040-00007>. Acesso em: 12 abr. 2018.

TORRES, Dawn M. *et al.* Rosiglitazone versus rosiglitazone and metformin versus rosiglitazone and losartan in the treatment of nonalcoholic steatohepatitis in humans: a 12-month randomized, prospective, open-label trial. **Hepatology**. Hoboken, v. 54, n. 5, p. 1631-1639, 2011. Disponível em: <https://aasldpubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/hep.24558>. Acesso em 22 mar. 2020.

TREVISAN, A. *et al.* Sex-related differences in renal toxicodynamics in rodents. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, Abingdon, v. 8, n. 9, p. 1173–1188, 2012. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/17425255.2012.698262>. Acesso em: 5 fev. 2019.

VOICAN, Cosmin Sebastian *et al.* Antidepressant-induced liver injury: a review for clinicians. **The American Journal of Psychiatry**, Abingdon, v. 171, n. 4, p. 404-415, 2014. Disponível em: https://ajp.psychiatryonline.org/doi/full/10.1176/appi.ajp.2013.13050709?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed. Acesso em: 5 abr. 2019.

WANG, J. *et al.* Prevalence of depression and depressive symptoms among outpatients: a systematic review and meta-analysis. **BMJ Open**, Londres, v. 7. e017173 2017. Disponível em: <https://bmjopen.bmj.com/content/7/8/e017173>. Acesso em: 5 fev. 2019.

WILLIAMS, Bryan *et al.* 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. **European Heart Journal**, Oxford, v. 39, n. 33, p. 3021-3104, 2018. Disponível em: <https://academic.oup.com/eurheartj/article/39/33/3021/5079119>. Acesso em 20 fev. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global status report on noncommunicable diseases 2014**. Genebra, 2014. Disponível em: <https://www.who.int/nmh/publications/ncd-status-report-2014/en/>. Acesso em: 20 fev. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Medication without harm – global patient safety challenge on medication safety**. Genebra, 2017. Disponível em: <https://apps.who.int/medicinedocs/documents/s23602en/s23602en.pdf>. Acesso em: 21 nov. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Depression**. Genebra, [2020?]. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/depression#tab=tab_1. Acesso em 23 mar. 2020.

YANG, Qiushi. *et al.* Sub-acute oral toxicity of a novel derivative of agomelatine in rats in a sex-dependent manner. **Frontiers in Pharmacology**. Lausanne, v. 10, n. 242, 2019. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2019.00242/full>. Acesso em: 5 fev. 2019.

ZAROS, Karin Juliana Bitencourt. O uso off label de medicamentos para obesidade. **Boletim do Centro de Informação de Medicamentos do Conselho Regional de Farmácia do Paraná**, Curitiba, n. 2, 2018. Acesso em: 12 fev. 2020.

ANEXO A – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Universidade Federal do Ceará
 Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
 Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
 Cep: 60430-270 Fortaleza-CE

Daniel G. G.

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “ESTUDO DE INTERAÇÃO MEDICAMENTOSA ENTRE A AGOMELATINA, LOSARTANA, METFORMINA E SINVASTATINA EM RATOS SOB TRATAMENTO SUB-CRÔNICO”, protocolo nº57/2016, sob responsabilidade do Prof. Dr. Gislei Frota Aragão, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de nº8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 28 de março de 2017.

Vigência do projeto	01/03/2017 a 28/02/2018
Espécie/Linhagem	Ratos Heterogênico Wistar
Nº de Animais	80
Peso/Idade	240-250g adultos
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UFC

Fortaleza, 30 de março de 2017

Alexandre Havt Bindá

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá
 Coordenador do CEUA - UFC

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
ALEXANDRE HAVT BINDÁ
 COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E DO USO COM
 ANIMAIS - CEUA/UFC - MATRÍCULA SIAPE: 196962