

RELATÓRIO FINAL

**FARMACOLOGIA DE SEGURANÇA DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL: AVALIAÇÃO
DO POTENCIAL EFEITO NEUROTÓXICO DA FOSFOETANOLAMINA (USP – São
Carlos)**

Estudo nº: 021-FSN-032-16

Patrocinador: **Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação - MCTI**

Esplanada dos Ministérios, Bloco E

Brasília, DF

Sumário

IDENTIFICAÇÃO	4
DECLARAÇÃO DE GARANTIA DA QUALIDADE	5
Datas	6
1. OBJETIVOS DO ESTUDO	6
2. PESSOAL ENVOLVIDO E SUAS ATRIBUIÇÕES	6
3. SUBSTÂNCIA TESTE, SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA, VEÍCULO, REAGENTES E SOLVENTES	6
3.1. Caracterização da Substância Teste	6
3.2. Caracterização do Veículo	7
3.3. Preparação da Substância Teste e do Veículo	7
3.4. Seleção das doses da Substância Teste	7
3.5. Justificativa para a seleção das doses da Substância Teste	7
4. SISTEMA TESTE	8
4.1. Justificativa para a seleção do Sistema Teste	8
4.2. Comitê de ética	8
4.3. Alojamento dos animais no Biotério de Criação	8
4.4. Aclimação dos animais no Biotério de Manutenção de roedores	9
4.5. Identificação dos animais	9
4.6. Condições ambientais	9
4.7. Condições de alimentação	9
4.8. Robustez, rastreabilidade, reprodutibilidade e confiabilidade dos dados	9
5. PROCEDIMENTOS DO ESTUDO	10
5.1. Desenho experimental	10
5.2 Metodologia	11
5.2.1 Ações pré-teste	11
5.2.2 Medida da temperatura corporal	12
5.2.3 Teste - Avaliações comportamentais e fisiológicas e sinais de neurotoxicidade	12
5.3. Grupos experimentais	14
5.4. Eutanásia	14
5.5. Análise de dados	14
6. RESULTADOS	14
6.1. Efeitos da Fosfoetanolamina Sintética (USP – São Carlos)	14
7. CONCLUSÃO	24

8. REGISTRO DE DADOS BRUTOS	24
9. EMENDAS E DESVIOS DO ESTUDO	24
10. ARQUIVAMENTO	24
11. REFERÊNCIAS	24
DECLARAÇÃO DO DIRETOR DE ESTUDO	26
DECLARAÇÃO DO GERENTE DA INSTALAÇÃO TESTE	27
ANEXO I – Certificado de sanitário animal	28
ANEXO II – Certificado da qualidade da água	29
ANEXO III - Grade padrão de observação	31
ANEXO IV - Validação do Teste de Irwin Modificado em Ratos	34

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

IDENTIFICAÇÃO

Título do Estudo	FARMACOLOGIA DE SEGURANÇA DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EFEITO NEUROTÓXICO DA FOSFOETANOLAMINA (USP – São Carlos)
Número do Estudo	021-FSN-032-16
Patrocinador	Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação - MCTI Telefone: +55 (61) 2033-7500 Esplanada dos Ministérios, Bloco E Brasília – DF CEP 70067-900
Instalação de Teste	Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clinicos Av. Luiz Boiteux Piazza, 1302 Florianópolis – SC Brasil CEP 88056-000
Diretor Presidente	Dr. João Batista Calixto Telefone: 48 32612856 E-mail: joao.calixto@cienp.org.br Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clinicos
Gerente da Instalação de Teste	Dr. Jarbas Mota Siqueira Junior Telefone: 48 32612856 E-mail: jarbas.siqueira@cienp.org.br Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clinicos
Diretora de Estudo	Dra. Edinéia Lemos de Andrade Telefone: 48 32612856 E-mail: edineia.andrade@cienp.org.br Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clinicos
Diretor de Estudo Substituto	Dr. Allisson Freire Bento Telefone: 48 32612856 E-mail: allisson.bento@cienp.org.br Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clinicos
Unidade da Garantia da Qualidade	Franciele Avila Silveira Telefone: 48 32612856 E-mail: franciele.silveira@cienp.org.br Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clinicos

DECLARAÇÃO DE GARANTIA DA QUALIDADE

Declaro que o Relatório Final foi revisado e reflete os Dados Brutos.

Declaro que foram realizadas auditorias, conforme descrito abaixo, não sendo observadas não conformidades que pudessem afetar a qualidade dos resultados.

Itens Auditados	Data da Auditoria	Data de relato ao DE*	Data de relato ao GIT#
Plano de Estudo	29/09/2016	29/09/2016	29/09/2016
Dados Brutos	25 e 26/10/2016	25 e 26/10/2016	25 e 26/10/2016
Relatório Final	26/10/2016	26/10/2016	26/10/2016

*DE: Diretor de Estudo; #GIT: Gerente da Instalação de Teste

Auditoria de estudo nº 021-FSN-032-16

Florianópolis, 26 de Outubro de 2016.



Franciele Avila Silveira

Coordenadora da Unidade de Garantia da Qualidade

Datas

Data do início do estudo: 29/09/2016

Data do início do ensaio: 02/10/2016

Data do término do ensaio: 06/10/2016

Data do término do estudo: 26/10/2016

1. OBJETIVOS DO ESTUDO

O presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial efeito neurotóxico da Substância Teste Fosfoetanolamina Sintética produzida pela USP (São Carlos) em ratos.

2. PESSOAL ENVOLVIDO E SUAS ATRIBUIÇÕES

Edinéia Lemos de Andrade, PhD	Diretora de Estudo
Daniela Ferraz Pereira Leite, PhD	Coordenadora de PDI
Juliana Cavalli, PhD	Apoio Técnico

3. SUBSTÂNCIA TESTE, SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA, VEÍCULO, REAGENTES E SOLVENTES

3.1. Caracterização da Substância Teste

Nome	: Fosfoetanolamina Sintética (USP - São Carlos)
Nome químico (IUPAC)	: Não se aplica
Número do CAS	: Não se aplica
Lote	: Não informado
Data de fabricação	: Não informado
Data de validade	: Não informado
Pureza/ Composição	: * ¹ Fosfoetanolamina - 32,2 %; Fosfatos inorgânicos - 34,9%; Monoetanolamina protonada - 18,2 %; Pirofosfatos Inorgânicos – 3,6 %, Fosfobisetanolamina – 3,9 %; Água – 7,2%. * ² Fosfoetanolamina - 16,9 %; Sal (de Ca ²⁺ , Zn ²⁺ ou Mg ²⁺) de Fosfoetanolamina - 45,6 %; Monoetanolamina - 37,5 %.
Fabricante	: Instituto de Química de São Carlos - USP
Aspectos físicos	: Cristal branco
Identificação CIEnP	: 021.3

^{*1} *Composição na íntegra do composto “Fosfoetanolamina-USP” em percentagem de massa - Dados fornecidos pela Unicamp.*

^{*2} *Composição da fração solúvel do composto “Fosfoetanolamina-USP” em percentagem de massa - Dados fornecidos pela USP.*

3.2. Caracterização do Veículo

Nome	: Solução de cloreto de sódio 0,9%
Lote	: 1601092
Data de validade	: 07/2017
Pureza	: Não se aplica
Fabricante	: Laboratório Tayuyna Ltda

3.3. Preparação da Substância Teste e do Veículo

A Substância Teste foi diluída em solução de cloreto de sódio 0,9 % com auxílio de agitador (vortex) e homogeneizador de hélice.

3.4. Seleção das doses da Substância Teste

Os animais foram tratados com as doses de 250, 1.000 e 2.500 mg/Kg da Substância Teste pela via oral. O esquema Terapêutico está descrito no item 5 - Procedimentos do Estudo.

3.5. Justificativa para a seleção das doses da Substância Teste

A estratégia experimental adotada visou detectar um possível efeito dependente da dose (Lakings, 2010). Conforme a literatura, a menor dose a ser utilizada é a dose eficaz, a dose intermediária seria de 2 a 4 vezes maior que a dose eficaz e a maior dose 4 a 10 vezes a dose eficaz (Lakings, 2010). Assim, a dose inicial utilizada foi de 250 mg/kg, a dose intermediária de 1.000 mg/kg e a dose maior de 2.500 mg/kg.

A dose inicial da Substância Teste foi estimada a partir de dados obtidos em estudo de eficácia para avaliação da atividade antitumoral da Substância Teste no modelo xenográfico de melanoma humano em camundongos nude (estudo nº 021-TXS-003-16). Neste estudo, a dose eficaz da Substância Teste foi de 500 mg/kg. A partir da conversão de doses entre as espécies, a qual leva em consideração a superfície corporal, a dose de 500 mg/kg utilizada em camundongos é equivalente a dose de 250 mg/kg para ratos (Freireich,

1966). Assim, a dose inicial da Substância Teste foi de 250 mg/kg e as doses subsequentes foram de 1.000 mg/kg (4 vezes a dose eficaz) e 2.500 mg/kg (10 vezes a dose eficaz).

4. SISTEMA TESTE

Foram utilizados animais machos saudáveis, da espécie *Rattus norvegicus* e linhagem “Sprague-Dawley”, com idade de 8 semanas, provenientes do Biotério de Criação do CIEnP. Os animais cujas matrizes foram adquiridas da empresa Charles River (EUA), foram criados sob condições SPF “Specific Pathogen Free” (ver certificado sanitário animal no Anexo I).

4.1. Justificativa para a seleção do Sistema Teste

Animais da espécie *Rattus norvegicus* e linhagem “Sprague Dawley” foram selecionados como Sistema Teste do presente estudo, por serem internacionalmente utilizados para testes de triagem de substâncias para avaliação do potencial neurotóxico (Moser et al., 1991). Além disso, são animais de fácil manejo.

4.2. Comitê de ética

Os procedimentos experimentais seguiram as normas dos Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O protocolo utilizado neste estudo foi revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Utilização Animal (CEUA) do CIEnP, sob o número 254/00 e está arquivado no CIEnP.

4.3. Alojamento dos animais no Biotério de Criação

Os animais foram acondicionados no Biotério de Criação do CIEnP em caixas conectadas em racks microisoladoras adquiridos da empresa Lab Products medindo (LxCxA): 45x31x19 cm (5 animais por gaiola). Todas as gaiolas possuíam forração tipo maravalha, material para nidificação (madeira Aspen) e um pequeno bloco de madeira Aspen como enriquecimento ambiental. A maravalha utilizada para a cama foi previamente autoclavada e renovada periodicamente para manter o ambiente seco e limpo.

4.4. Aclimação dos animais no Biotério de Manutenção de roedores

Os animais utilizados neste estudo foram acondicionados no Biotério de Manutenção de roedores do CIEnP, em gaiolas conectadas a racks microisoladoras da empresa ALESCO medindo (LxCxA): 48,2x33,1x21,4 cm (5 animais por gaiola), para aclimação por um período de, no mínimo, 4 dias.

4.5. Identificação dos animais

Cada gaiola foi identificada com o nome do Diretor de Estudo, número do estudo, animal, linhagem, sexo, grupo experimental e data de início e término do estudo. Durante os experimentos, cada animal foi identificado com uma marcação na cauda, de acordo com o POP E.10/versão atual – Identificação de Animais para Estudos.

4.6. Condições ambientais

Tanto no Biotério de Criação, quanto no Biotério de Manutenção de roedores do CIEnP, as gaiolas foram limpas e desinfetadas semanalmente. A temperatura da sala foi ajustada para 21 ± 2 °C com faixa de umidade de 45 - 70 %. Os animais foram mantidos em um ciclo claro/escuro de 12h, sendo que o ciclo claro iniciou às 6:30 da manhã. A sala de manutenção de roedores possui as mesmas condições de temperatura e umidade do biotério do CIEnP.

4.7. Condições de alimentação

Os animais receberam água e ração *ad libitum* por todo o período do estudo, sendo a ração da marca Nuvital CR1[®] (Quimtia, Colombo, Paraná, Brasil) autoclavada, e a água, filtrada, clorada e embalada na máquina *Hydropac* (Lab Products, Belcamp, Maryland, EUA). O CIEnP realiza mensalmente a avaliação de potabilidade da água fornecida aos animais (ver certificado de análise da qualidade da água no Anexo II).

4.8. Robustez, rastreabilidade, reprodutibilidade e confiabilidade dos dados

Visando reduzir ao máximo desvios que pudessem interferir na confiabilidade, rastreabilidade e na reprodutibilidade dos resultados do estudo, foram empregados alguns critérios propostos pelo ARRIVE (do inglês, *Animal Research Reporting In Vivo Experiments*) (Kilkenny et al., 2010) e adotados pelos periódicos *British Journal of Pharmacology* (McGrath

e Liley, 2015) e *Biochemical Pharmacology* (Mullane et al., 2015). Para isso, os seguintes procedimentos foram rigorosamente aplicados desde o planejamento experimental até a realização dos experimentos: 1) Nenhum dado foi omitido para efeito da análise dos resultados; 2) Os animais foram distribuídos aleatoriamente nos diferentes grupos experimentais; 3) Todos os reagentes foram usados dentro do prazo de validade indicado pelo Fabricante; 4) Todos dados brutos gerados foram pronta e imediatamente registrados pelo pessoal responsável pela condução do estudo e foram auditados pela UGQ; 5) O número de animais em cada grupo experimental foi o recomendado pela literatura (Lakings, 2010); 6) Todos os experimentos foram realizados de forma cega, ou seja, o experimentador não tinha conhecimento prévio quanto ao tratamento com as diferentes doses da Substância Teste (exceto o tratamento com o Veículo para efeito comparador); 7) Os experimentos foram conduzidos em dois blocos (manhã e tarde) e tiveram todos os grupos experimentais representados a cada bloco.

5. PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

5.1. Desenho experimental

O Teste de Irwin integra a bateria de testes fundamentais para avaliação da Farmacologia de Segurança do sistema nervoso central (SNC), preconizada pelo guia ICH S7A (2000). Através deste teste é possível investigar o potencial efeito neurotóxico de substâncias através de uma série de avaliações (observacionais e interativas). Os dados obtidos no Teste de Irwin podem ser agrupados em categorias relacionadas: (1) aos efeitos sobre a atividade geral (excitação/sedação), (2) ao comportamento motor/coordenação, (3) a modificação da resposta a diferentes estímulos, e (4) aos sinais autonômicos.

Para a realização do teste, no dia -1, os animais foram pesados, distribuídos nos diferentes grupos experimentais, depilados e mantidos na sala de experimentação para ambientação (para detalhes ver item 5.2.1). No dia 0, a temperatura corporal basal foi mensurada e os tratamentos realizados. Os animais foram tratados com o Veículo (salina, 5 mL/kg, via oral) ou com a Substância Teste nas seguintes doses: dose 1 (250 mg/kg), dose 2 (1.000 mg/kg) e dose 3 (2.500 mg/Kg). Os animais tratados com as diferentes doses da Substância Teste foram avaliados pelo experimentador de maneira cega. No entanto, o grupo tratado com Veículo (controle negativo) foi identificado durante os testes, pois serviu como referência comportamental para avaliar as possíveis alterações induzidas pela Substância Teste em cada período de avaliação.

Cada animal foi avaliado nos seguintes períodos: 0-15; 15; 30; 120; 240 minutos e 24 horas após a administração como mostrado na Figura 1. A escolha dos períodos de avaliação foi de acordo com o perfil farmacocinético da Substância Teste descrito em estudo prévio (nº 021-PKB-023-15).

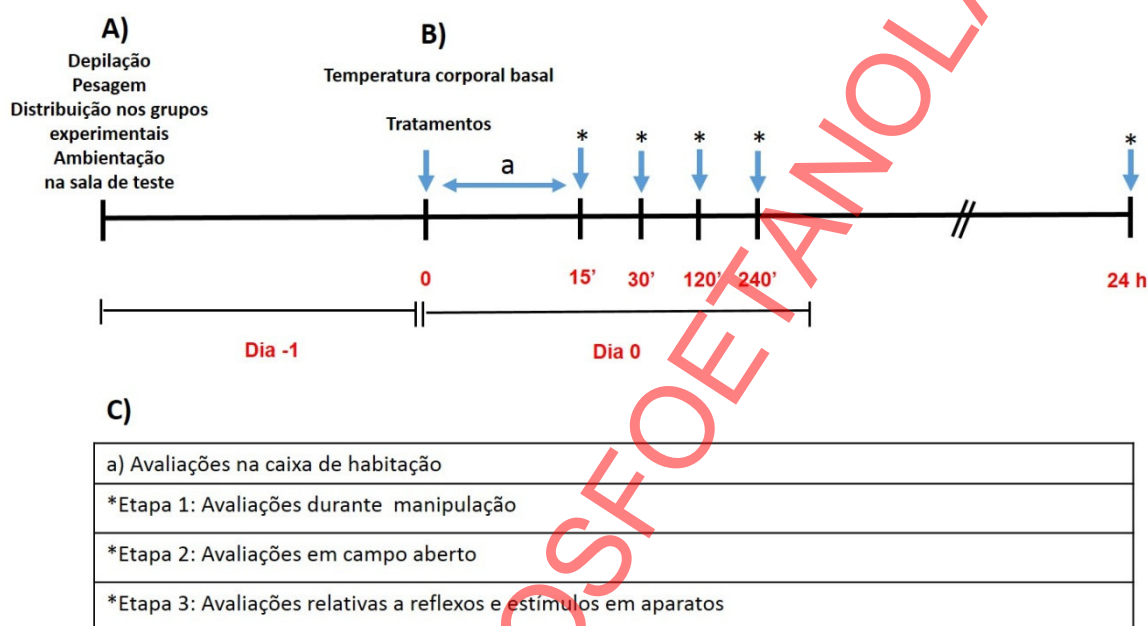


Figura 1: Desenho experimental para avaliação do potencial efeito neurotóxico agudo da Substância Teste utilizando o Teste de Irwin. (A) Pré-teste (dia -1): no dia anterior ao início do teste, os animais foram pesados, distribuídos nos grupos experimentais, depilados e ambientados na sala de experimentação. (B) Teste (dia 0): a temperatura corporal basal dos animais foi verificada e em seguida, no tempo 0, os animais receberam Veículo (salina, 5 mL/kg) ou a Substância Teste nas doses de 250 mg/kg; 1.000 mg/kg e 2.500 mg/kg pela via oral. Cada animal foi avaliado nos seguintes períodos: 0-15; 15; 30; 120; 240 minutos e 24 horas após a administração. (C) Avaliações registradas: a ordem de testes progrediu do procedimento menos invasivo para o mais invasivo, ou seja, iniciando com as avaliações dentro da caixa de habitação (a) e medida da temperatura corporal no tempo de 0-15 min, seguido por um circuito de avaliações que consistiu de 3 etapas: etapa 1: avaliações realizadas durante a manipulação para a transferência ao novo ambiente; etapa 2: avaliações no campo aberto durante 3 minutos de período exploratório; etapa 3: avaliações que incluíram resposta à diferentes estímulos utilizando aparatos. Ao final da etapa 3, os animais foram devolvidos à caixa de habitação. Todas as etapas deste circuito de avaliações foram completadas em cada período de avaliação (15; 30; 120; 240 minutos e 24 horas).

5.2 Metodologia

5.2.1 Ações pré-teste

Inicialmente os animais foram identificados por marcação na cauda conforme POP-E.10/versão atual e pesados de acordo com os procedimentos descritos no POP.E.01/versão atual. Posteriormente os mesmos foram distribuídos em 4 grupos experimentais de forma que

a variação de peso dos animais não excedesse a $\pm 20\%$ do peso médio. Cada grupo experimental foi então aleatoriamente definido.

Todos os animais foram depilados na região do dorso, sob anestesia com isoflurano 3 a 5% (concomitantemente com um fluxo corrente de oxigênio de 3 a 4 litros por minuto), para possibilitar a verificação da temperatura corporal. Posteriormente, os animais foram alocados na sala de teste para ambientação onde permaneceram entre 15-20h, com ração e água *ad libitum*, exceto no dia do teste, no qual a ração e a água foram removidas imediatamente antes do início dos tratamentos e recolocadas após o último período de avaliação do dia (240 minutos).

5.2.2 Medida da temperatura corporal

A temperatura corporal foi mensurada com auxílio de termômetro digital infravermelho (Morning Sun Electrical, modelo DT-8806C) direcionado ao dorso dos animais. A temperatura corporal média foi obtida a partir de três medidas consecutivas.

5.2.3 Teste - Avaliações comportamentais e fisiológicas e sinais de neurotoxicidade

As alterações comportamentais e fisiológicas e sinais de neurotoxicidade foram registradas de acordo com uma grade padrão de observação descrita previamente por Irwin (1968) para camundongos e adaptada para ratos (Teste de Irwin modificado) (Anexo III).

Nos primeiros 15 minutos após os tratamentos, os animais foram avaliados dentro da própria caixa de habitação. Nesse período, a temperatura corporal foi mensurada e foram verificadas a postura do animal (coordenação motora) e a presença de comportamentos atípicos tais como; convulsão, tremores, estereotípias, entre outros. No demais períodos (15, 30, 120, 240 minutos e 24 horas após os tratamentos), os animais foram avaliados em uma série de etapas que constituiriam em um circuito, totalizando 5 circuitos para cada animal, a cada período avaliado, como segue:

Etapa 1) avaliações realizadas durante a manipulação dos animais para a transferência a um novo ambiente: facilidade de remoção da caixa de habitação para o campo aberto, tônus muscular, salivação e lacrimejamento;

Etapa 2) avaliações realizadas no novo ambiente (campo aberto) durante 3 minutos de exploração: marcha anormal, perda de balanço, perda da coordenação motora, entre outras;

Etapa 3) avaliações relativas a reflexos e estímulos em aparatos: reflexo da córnea, reatividade ao toque, tônus muscular, reflexo de endireitamento da postura, reflexo de retirada da pata/vocalização, tração, força de agarramento, acinesia e catalepsia.

Todas as etapas deste circuito foram realizadas em cada período de avaliação. A avaliação ao longo do circuito levou em torno de 5 minutos para cada animal. Em cada bloco de experimento (manhã e tarde), um animal de cada grupo experimental foi analisado. Finalizadas todas as etapas, os animais foram retornados à caixa de habitação. Ao início de um novo circuito (novo período de avaliação), ainda na caixa de habitação, a temperatura corporal foi novamente mensurada.

Para as avaliações realizadas durante a exploração em um novo ambiente foi utilizado o campo aberto, que consiste de uma caixa de acrílico medindo 60x40x22 cm. Para cada grupo experimental foi utilizado um campo aberto individual. Para a avaliação da tração foi utilizado um aparato constituído de uma barra dupla fixada por dois suportes verticais (primeira barra 27x29 cm; segunda barra 27x40 cm; diâmetro de ambas as barras 0,4 cm). O aparato para a medida da força de agarramento e acinesia consiste de uma grade de metal retangular (73x22 cm). Para avaliação do reflexo de retirada da pata/vocalização, foi utilizada uma pinça cirúrgica para, cuidadosamente, pinçar a ponta dos dedos de uma das patas traseiras do animal. O pinçamento foi realizado suavemente e com força progressiva, de modo a deflagrar o comportamento de retirada da pata ou vocalização.

5.3. Grupos experimentais

Os animais foram separados em 4 diferentes grupos experimentais descritos abaixo que foram determinados aleatoriamente.

Tabela 1. Representação dos grupos experimentais, tratamento, periodicidade, dose, via de administração, volume administrado e número de animais por grupo experimental.

Grupos experimentais	Controle	Fosfoetanolamina Sintética – USP (São Carlos)		
Tratamento	Salina	Dose 1	Dose 2	Dose 3
Periodicidade	1 vez	1 vez	1 vez	1 vez
Dose	-	250 mg/Kg	1.000 mg/Kg	2.500 mg/kg
Via de Administração	oral	oral	oral	oral
Volume de Administração	5 mL/kg	5 mL/kg	5 mL/kg	5 mL/kg
Animal por Grupo	6	6	6	6

5.4. Eutanásia

Ao final do protocolo os animais foram eutanasiados através de câmara de CO₂ conforme POP E.11/versão atual e Guia Brasileiro de Boas Práticas em Eutanásia em Animais.

5.5. Análise de dados

Os dados foram representados como a presença do efeito e foram apresentados na tabela de resultados como o número de animais apresentando determinado efeito (expresso como x/n, onde x é número de animais que apresentaram o efeito e n é a amostragem total).

6. RESULTADOS

6.1. Efeitos da Fosfoetanolamina Sintética (USP – São Carlos)

No presente estudo, o tratamento oral dos animais com a Fosfoetanolamina Sintética (USP – São Carlos) (250, 1.000 ou 2.500 mg/kg, via oral) não resultou em nenhum efeito sobre os parâmetros comportamentais e fisiológicos ou em sinais de neurotoxicidade nos tempos avaliados, quando comparado ao grupo que recebeu o Veículo (Salina 0,9%). Os dados referentes a esses resultados estão apresentados nos Quadros 1, 2 e 3.

Quadro 1. Sinais clínicos e comportamentos observados no Teste de Irwin modificado após a administração da Fosfoetanolamina Sintética (USP – São Carlos) (250 mg/kg)																
Dose e via		Veículo (Salina, 5 mL/kg, via oral)							Fosfoetanolamina 250 mg/kg (via oral)							
Parâmetros avaliados		Períodos de avaliação														
		0-15 m	15 m	30 m	60m	120 m	240 m	24 h		0-15 m	15 m	30 m	60m	120 m	240 m	24 h
Morte		-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-
Convulsão	Excitação	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-
Tremor		-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-
Cauda de Straub		-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-
Excitação discreta (+)		-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-
Excitação moderada (++)		-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-
Excitação pronunciada (+++)		-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-
Comportamento de saltar		-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-
Reatividade ao toque aumentada		-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-
Comportamento de medo/susto		-	2/6	3/6	2/6	1/6	2/6	1/6		-	2/6	-	-	-	-	-
Tônus muscular aumentado		-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-
Agressão	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	

Continuação Quadro 1.

Perda do reflexo de endireitamento da postura	Sedação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Perda do reflexo da córnea		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sedação discreta (+)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sedação moderada (++)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sedação pronunciada (+++)	Sedação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Reatividade ao toque diminuída		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Comportamento de medo/susto diminuído		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tônus muscular diminuído		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pisada de pata dianteira	Estereotipia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Contorções de cabeça		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Estereotipia (comportamento de farejar)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Estereotipia (mastigação)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Estereotipia (movimentos de cabeça atípicos)	Estereotipia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Comportamento de coçar		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-Cataplexia		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acinesia		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Descoordenação motora (cruzamento de patas)	Motor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Perda de balanço (cambalejar e cair)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Marcha anormal: locomoção na ponta das patas		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Marcha anormal: desequilíbrio (cambalejar sem cair)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Perda de tração	Motor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Perda da força de agarramento		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Reflexo de retirada da pata/vocalização	Noçãoção	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Continuação Quadro 1.

Ptose	Autonômico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Exoftalmia		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Piloereção		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Defecação		-	5/6	2/6	2/6	2/6	3/6	4/6	-	6/6	3/6	2/6	3/6	3/6	1/6	-
Salivação		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lacrimejamento		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Respiração aumentada	Outras medidas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Respiração diminuída		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hipotermia +: diminuição > 1°C		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hipotermia ++: diminuição > 2°C		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hipotermia +++: diminuição > 3°C		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hipertermia +: aumento > 1°C		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hipertermia ++: aumento > 2°C		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hipertermia +++: aumento > 3°C		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Os dados são apresentados como o número de animais apresentando os sinais clínicos e/ou comportamentos durante o teste. (x/n) indica o número de animais apresentando os sinais clínicos/comportamentos na amostragem. As observações foram realizadas nos seguintes períodos: 0-15, 15, 30, 60, 120 e 240 minutos e 24 horas após o tratamento.

Quadro 2. Sinais clínicos e comportamentos observados no Teste de Irwin modificado após a administração da Fosfoetanolamina Sintética (USP – São Carlos) (1.000 mg/kg)																
Dose e via		Veículo (Salina, 5 mL/kg, via oral)							Fosfoetanolamina 1.000 mg/kg (via oral)							
Parâmetros avaliados		Períodos de avaliação														
		0-15 m	15 m	30 m	60m	120 m	240 m	24 h		0-15 m	15 m	30 m	60m	120 m	240 m	24 h
Morte		-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-
Convulsão	Excitação	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-
Tremor		-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-
Cauda de Straub		-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-
Excitação discreta (+)		-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-
Excitação moderada (++)		-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-
Excitação pronunciada (+++)		-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-
Comportamento de saltar		-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-
Reatividade ao toque aumentada		-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-
Comportamento de medo/susto		-	2/6	3/6	2/6	1/6	2/6	1/6		-	1/6	1/6	1/6	-	-	1/6
Tônus muscular aumentado		-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-
Agressão	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	

Continuação Quadro 2.

Perda do reflexo de endireitamento da postura	Sedação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Perda do reflexo da córnea		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sedação discreta (+)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sedação moderada (++)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sedação pronunciada (+++)	Sedação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Reatividade ao toque diminuída		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Comportamento de medo/susto diminuído		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tônus muscular diminuído		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pisada de pata dianteira	Estereotipia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Contorções de cabeça		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Estereotipia (comportamento de farejar)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Estereotipia (mastigação)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Estereotipia (movimentos de cabeça atípicos)	Estereotipia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Comportamento de coçar		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalepsia		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acinesia		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Descoordenação motora (cruzamento de patas)	Motor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Perda de balanço (cambalejar e cair)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Marcha anormal: locomoção na ponta das patas		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Marcha anormal: desequilíbrio (cambalejar sem cair)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Perda de tração	Motor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Perda da força de agarramento		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Reflexo de retirada da pata/vocalização		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Noçãoção	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Continuação Quadro 2.

Ptose	Autonômico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Exoftalmia		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Piloereção		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Defecação		-	5/6	2/6	2/6	2/6	3/6	4/6	-	3/6	3/6	2/6	1/6	4/6	5/6	-
Salivação		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lacrimejamento		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Respiração aumentada	Outras medidas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Respiração diminuída		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hipotermia +: diminuição > 1°C		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hipotermia ++: diminuição > 2°C		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hipotermia +++: diminuição > 3°C		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hipertermia +: aumento > 1°C		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hipertermia ++: aumento > 2°C		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hipertermia +++: aumento > 3°C		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Os dados são apresentados como o número de animais apresentando os sinais clínicos e/ou comportamentos durante o teste. (x/n) indica o número de animais apresentando os sinais clínicos/comportamentos na amostragem. As observações foram realizadas nos seguintes períodos: 0-15, 15, 30, 60, 120 e 240 minutos e 24 horas após o tratamento.

FARMACOLOGIA DE SEGURANÇA DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EFEITO NEUROTÓXICO DA FOSFOETANOLAMINA (USP – São Carlos)

Quadro 3. Sinais clínicos e comportamentos observados no Teste de Irwin modificado após a administração da Fosfoetanolamina Sintética (USP – São Carlos) (2.500 mg/kg)																
Dose e via		Veículo (Salina, 5 mL/kg, via oral)							Fosfoetanolamina 2.500 mg/kg (via oral)							
Parâmetros avaliados		Períodos de avaliação														
		0-15 m	15 m	30 m	60m	120 m	240 m	24 h		0-15 m	15 m	30 m	60m	120 m	240 m	24 h
Morte		-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-
Convulsão	Excitação	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-
Tremor		-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-
Cauda de Straub		-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-
Excitação discreta (+)		-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-
Excitação moderada (++)		-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-
Excitação pronunciada (+++)		-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-
Comportamento de saltar		-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-
Reatividade ao toque aumentada		-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-
Comportamento de medo/susto		-	2/6	3/6	2/6	1/6	2/6	1/6		-	3/6	1/6	-	-	-	-
Tônus muscular aumentado		-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-
Agressão	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	

Continuação Quadro 3.

Perda do reflexo de endireitamento da postura	Sedação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Perda do reflexo da córnea		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sedação discreta (+)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sedação moderada (++)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sedação pronunciada (+++)	Sedação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Reatividade ao toque diminuída		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Comportamento de medo/susto diminuído		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tônus muscular diminuído		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pisada de pata dianteira	Estereotipia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Contorções de cabeça		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Estereotipia (comportamento de farejar)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Estereotipia (mastigação)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Estereotipia (movimentos de cabeça atípicos)	Estereotipia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Comportamento de coçar		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalepsia		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acinesia		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Descoordenação motora (cruzamento de patas)	Motor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Perda de balanço (cambalejar e cair)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Marcha anormal: locomoção na ponta das patas		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Marcha anormal: desequilíbrio (cambalejar sem cair)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Perda de tração	Motor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Perda da força de agarramento		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Reflexo de retirada da pata/vocalização		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Noçãoção	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Continuação Quadro 3.

Ptose	Autonômico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Exoftalmia		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Piloereção		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Defecação		-	5/6	2/6	2/6	2/6	3/6	4/6	-	3/6	3/6	2/6	3/6	5/6	6/6	-
Salivação		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lacrimejamento		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Respiração aumentada	Outras medidas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Respiração diminuída		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hipotermia +: diminuição > 1°C		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hipotermia ++: diminuição > 2°C		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hipotermia +++: diminuição > 3°C		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hipertermia +: aumento > 1°C		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hipertermia ++: aumento > 2°C		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hipertermia +++: aumento > 3°C		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Os dados são apresentados como o número de animais apresentando os sinais clínicos e/ou comportamentos durante o teste. (x/n) indica o número de animais apresentando os sinais clínicos/comportamentos na amostragem. As observações foram realizadas nos seguintes períodos: 0-15, 15, 30, 60, 120 e 240 minutos e 24 horas após o tratamento.

O modelo utilizado para a realização do presente estudo foi previamente validado com a utilização de drogas conhecidas (controles positivos) e o relatório dessa validação está apresentado no Anexo IV.

7. CONCLUSÃO

O conjunto de resultados obtidos no presente estudo permite concluir que a Substância Teste Fosfoetanolamina Sintética (USP-São Carlos) não causou neurotoxicidade aguda em ratos, uma vez que não foi observada qualquer alteração significativa nos diversos parâmetros avaliados em nenhuma das doses testadas.

8. REGISTRO DE DADOS BRUTOS

Todos os dados brutos e observações relacionadas ao estudo foram registrados prontamente em formulário adequado.

9. EMENDAS E DESVIOS DO ESTUDO

Emendas e desvios ao plano de estudo, quando necessários, foram justificados, aprovados, datados e mantidos junto ao Plano de Estudo.

10. ARQUIVAMENTO

Uma cópia original do Plano de Estudo, Dados Brutos e Relatório Final será arquivada por, no mínimo, 5 anos no CIEnP. A Substância Teste será armazenada no CIEnP até a expiração de sua validade.

11. REFERÊNCIAS

ICH S7A: Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals, 2000.

Guia Brasileiro de Boas Práticas em Eutanásia em Animais - Conceitos e Procedimentos Recomendados. Conselho Federal de medicina Veterinária (CFMV), Brasília, 2013.

Castagné V, Froger-Colléaux C, Esneault E, Anne Marie H, Lemaire M, Porsolt RD. Central Nervous System (CNS) Safety Pharmacology Studies. In: Vogel HG, Maas J, Hock FJ, Mayer

D, editors. Drug Discovery and Evaluation: Safety and Pharmacokinetic Assays. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2013. p. 17-72.

Freireich, EJ, Gehan EA, Rall DP, Schmidt LH, Skipper HE. Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, dog, monkey and man. Cancer Chemother Rep. 50(4):219-244, 1966.

Irwin S. Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. Psychopharmacologia. 13:222-257, 1968.

Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Animal research: reporting in vivo experiments: The ARRIVE guidelines. PLoS Biol. 8 (6): e1000412, 2010.

Lakings DB. Nonclinical Safety Pharmacology Studies Recommended for Support of First-in-Human Trials Clinical Trials. In: Mitchell NC, editor. Early Drug Development: Strategies and Routes to First-in-Human Trials . John Wiley and Sons, Inc., 2010. p.249-280.

McGrath JC, Lilley E. Implementing guidelines on reporting research using animals (ARRIVE etc.): new requirements for publication in BJP. Br J Pharmacol. 172(13):3189-3193, 2015.

Moser VC, McDaniel KL, Phillips PM. Rat strain and stock comparisons using a functional observational battery: baseline values and effects of amitraz. Toxicol Appl Pharmacol. 108(2):267-283, 1991.

Mullane K, Enna SJ, Piette J, Williams M. Guidelines for manuscript submission in the peer-reviewed pharmacological literature. Biochemical Pharmacology, 97: 225-235, 2015.

DECLARAÇÃO DO DIRETOR DE ESTUDO

Eu, abaixo assinado, declaro que este estudo foi realizado sob a minha supervisão, conforme os procedimentos nele descritos. Os resultados apresentados referem-se a Substância Teste utilizada.



Dra Edinéia Lemos de Andrade

Diretora do Estudo

26/10/16

Data

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

DECLARAÇÃO DO GERENTE DA INSTALAÇÃO TESTE

Nós, abaixo assinados, declaramos que este estudo representa o registro preciso e verdadeiro dos resultados obtidos.

Este documento não deve ser reproduzido parcialmente.

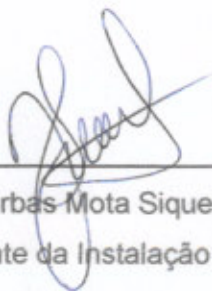


Dr. João Batista Calixto

Diretor Presidente

26/10/2016

Data



Dr. Jarbas Mota Siqueira Junior

Gerente da Instalação Teste

26/10/2016

Data

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

FARMACOLOGIA DE SEGURANÇA DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EFEITO NEUROTÓXICO DA FOSFOETANOLAMINA (USP – São Carlos)

ANEXO I – Certificado de sanitário animal

CERTIFICADO SANITÁRIO

Os animais criados no CIEnP são classificados sanitariamente como SPF (Specific Pathogen Free), conforme Relatório Técnico emitido pela Neoprosecta Microbiome Technologies (Junho/2016) e não apresentam os seguintes patógenos:

VÍRUS	BACTÉRIAS/FUNGOS	PARASITAS
Vírus Sendai	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>Giardia sp</i>
Vírus da Pneumonia Murina	<i>Cilia-Associated Respiratory Bacillus</i>	<i>Spironucleus sp</i>
Vírus da Hepatite Murina	<i>Citrobacter rodentium</i>	<i>Tritrichomonas muris</i>
ParvoVírus de camundongo Mouse parvovirus-1 - MPV e Minute Virus of Mice - MVM	<i>Corynebacterium kutscheri</i>	<i>Tritrichomonas minuta</i>
Vírus da Encefalomielite Murina de Theiler	<i>Helicobacter bilis</i>	<i>Entamoeba muris</i>
Reovírus murino tipos 1, 2 e 3	<i>Helicobacter hepaticus</i>	<i>Chilomastix bettencourti</i>
Vírus da Diarréia Epizootica de camundongos recém- nascidos	<i>Helicobacter sp.</i>	<i>Myobia musculi</i>
AdenoVírus de camundongo	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Myocoptes musculus</i>
PoliomaVírus K	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Radfordia affinis</i>
Citomegalovírus de camundongo	<i>Mycoplasma pulmonis</i>	<i>Polyplax serrata</i>
Vírus do timo do camundongo ou Murid herpesvírus 3	<i>Pasteurella multocida</i>	<i>Radfordia ensifera</i>
Vírus da Coriomeningite Linfocítica	<i>Pasteurella pneumotropica</i>	<i>Eimeria sp</i>
HantaVírus	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Cryptosporidium sp</i>
Vírus ectromelia	<i>Salmonella moniliformis</i>	<i>Syphacia muris</i>
Vírus da elevação da lactato dehidrogenase	<i>Salmonella sp</i>	
NoroVírus Murino	<i>Staphylococcus aureus</i>	
Vírus Sialodacrioadenitis	<i>Staphylococcus sp</i>	
Parvovírus (RV, H-1, RMV, RPV-1A)	<i>Streptococcus beta hemolítico (Streptococcus pyogenes)</i>	
Theliovírus	<i>Streptococcus moniliformis</i>	
Vírus da Diarreia Viral	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
Vírus Respiratório Sincicial	<i>Tizzer (Clostridium piliformes)</i>	
Vírus Parainfluenza 3	<i>Pneumocystis murina</i>	
Adenovírus	<i>Pneumocystis wakefieldiae</i>	
Herpesvírus 1	<i>Trichophyton sp</i>	
Herpesvírus 1 e 5	<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	
Vaccinia vírus (Poxvírus)		

crisp incipiens affinis muris

Responsável Técnica –
Médica Veterinária
CRMV SC 05851

Centro de Inovação e Ensaio Pré-Clinico - Av. Luiz Boiteux Piazza, 1302 Florianópolis – SC – Brasil

FARMACOLOGIA DE SEGURANÇA DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EFEITO NEUROTÓXICO DA FOSFOETANOLAMINA (USP – São Carlos)

ANEXO II – Certificado da qualidade da água



RELATÓRIO DE ENSAIO

Cod.: A_560.2016_AP_1_1

São José, 05 de outubro de 2016

DADOS DO CLIENTE

Cliente: Ciemp Centro de Inovação e Ensaios Pré Clínicos
Endereço: Av. Luiz Boiteux Piazza, 1302

Cidade: Florianópolis, Santa Catarina
CEP: 88.056-000
Fone: (48) 3261-2856

DADOS DA AMOSTRA

Amostra: 560.2016_AP_1_1
Procedência: Água Potável
Ponto Coleta: Água Potável - Água para os animais do biotério
Temperatura Amostra no receb.: 8,0 °C
Data Recebimento: 26/09/2016 18:00

Responsável pela Coleta: Cliente
Data/Hora Coleta: 23/09/2016

1ª Legislação: Portaria MS 2914 de 12/12/2011 (Federal)

PARÂMETRO	LEGISLAÇÃO	RESULTADO	UNIDADE
Alumínio Total	≤ 0,2 mg/L	<0,10	mg Al/L
Cloretos	≤ 250 mg/L	17,85	mg Cl-/L
Cloro Residual Livre	entre 0,2 e 5,0 mg/L	0,230	mg/L
Condutividade		134,80	µS/cm
Contagem de Coliformes Termotolerantes	Ausência	Ausente	UFC/100mL
Contagem de Coliformes Totais	Ausência	Ausente	UFC/100mL
Cor Aparente	≤ 15 Pt/Co	<0,20	Pt/Co
Dureza Total	≤ 500 mg/L	41,00	mg CaCO3/L
Ferro Total	≤ 0,3 mg/L	<0,01	mg Fe/L
Fluoreto total	≤ 1,5 mg/L	0,78	mg F- /L
Manganês Total	≤ 0,1 mg/L	0,043	mg Mn/L
Nitrato (como N)	≤ 1 mg/L	<0,02	mg/L NO2-N
Odor	-	Ausente	-
pH	entre 6,0 e 9,5 pH a 25°C	7,97	pH a 25°C
Turbidez	≤ 5 NTU	0,370	NTU

DADOS COMPLEMENTARES DO ENSAIO

PARÂMETRO	LO	U95%	MÉTODO	DATA REALIZAÇÃO
Alumínio Total	0,10	0,06	SMEWW 22ª edition Method 3500 B	30/09/2016
Cloretos	10,50	-	SMEWW - 22ª nd. 2012, Method 4500 Cl B	28/09/2016
Cloro Residual Livre	0,010	0,041	EPA 330.5, APHA 4500 - Cl2 G	27/09/2016
Condutividade	0,01	3,7	SMEWW 22ª edition Method 2510 B	27/09/2016
Contagem de Coliformes Termotolerantes	Ausente	-	SMEWW 22ª edition Method 9222 A, 9222 B e 9222 D	28/09/2016
Contagem de Coliformes Totais	Ausente	-	SMEWW 22ª edition Method 9222 A, 9222 B e 9222 D	28/09/2016
Cor Aparente	0,20	0,04	SMEWW 22ª edition Method 2120 C	27/09/2016

FARMACOLOGIA DE SEGURANÇA DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL: AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL EFEITO NEUROTÓXICO DA FOSFOETANOLAMINA (USP – São Carlos)



RELATÓRIO DE ENSAIO

Cod.: A_560.2016_AP_1_1

DADOS COMPLEMENTARES DO ENSAIO

PARÂMETRO	LQ	U95%	MÉTODO	DATA REALIZAÇÃO
Dureza Total	1,85	-	SMEWW 22ª edition Method - 2340-C	03/10/2016
Ferro Total	0,01	0,04	SMEWW 22ª edition Method 3111 B	28/09/2016
Fluoreto total	0,10	0,03	EPA 340.3, APHA 4500-F- E	03/10/2016
Manganês Total	0,010	0,058	DIN 38406-2	03/10/2016
Nitrito (como N)	0,02	0,02	EPA 354.1, APHA 4500 - NO2 - B, DIN EN 26777	28/09/2016
Odor	-	-	MAPA PORT. Nº 01, de 07/01/10#81	28/09/2016
pH	1,00	0,03	SMEWW 22ª edition Method 4500-H	27/09/2016
Turbidez	0,158	1,00	SMEWW 22ª edition Method 2130 B	27/09/2016

Nota 01: As amostragens realizadas pela AQUAVITA seguem o Plano de Amostragem (DQ 5.7.01).

Nota 02: Os resultados referem-se somente aos itens ensaiados.

Nota 03: LQ - Limite que Quantificação.

Nota 04: Este relatório só pode ser reproduzido por completo, a reprodução de partes requer a aprovação por escrita da AquaVita.

Nota 05: Verifique a autenticidade deste relatório no site <http://www.laboratorioaquavita.com.br>

O(s) parâmetro(s) analisado(s) da referida amostra está(ão) de acordo com a legislação vigente.

Verifique a autenticidade deste documento no endereço abaixo ou no QR-Code ao lado.:

<http://www.laboratorioaquavita.com.br>

Código: 560.2016 - Chave de autenticação: WY6-3I99-5BP



Bohm
Ana Paula Gonçalves Bohm
CRQ 13101074

ANEXO III - Grade padrão de observação

Quadro 4. Grade padrão para registro de sinais clínicos observados no Teste de Irwin modificado	
Sinais	Observações
Domínio Comportamental	
Reatividade ao toque	Aumento ou diminuição - Reação de fuga do animal à pressão dos dedos para baixo no quarto traseiro em comparação ao grupo controle
Sedação	Três intensidades: +: após retirada da caixa e manipulação, o animal move-se mais lentamente em comparação ao animal do grupo controle ++: sob as mesmas condições, o animal move-se muito lentamente +++: sob as mesmas condições, o animal não se move
Excitação	Três intensidades: +: após retirada da caixa e manipulação, o animal é discretamente mais ativo que o animal do grupo controle ++: sob as mesmas condições, o animal move-se rapidamente +++: sob as mesmas condições, o animal se move muito rapidamente
Catalepsia	Presença - Quando colocado em “posição de Buda”, o animal não se move
Morte*	Presença Indicar o tempo de surgimento
Convulsão*	Presença Indicar o tempo de surgimento
Estereotipia*	Presença - Movimentos repetidos anormais: comportamento de farejar, mastigação, movimentos de cabeça atípicos
Contorções de cabeça*	-Presença Movimento rápido axial de um lado para outro da cabeça
Comportamento de coceira*	-Presença Coceira com as patas dianteiras ou traseiras em qualquer parte do corpo
Agressão	Presença - Tentativa de mordida quando há aproximação de uma caneta em direção à cabeça - Tentativa de mordida em direção a outros animais ou ao experimentador
Tremor*	Presença Tremor corporal disseminado ou em parte do corpo
Cauda de Straub*	Presença Cauda rígida na posição vertical e tendência do animal em curvar o dorso

FARMACOLOGIA DE SEGURANÇA DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EFEITO NEUROTÓXICO DA FOSFOETANOLAMINA (USP – São Carlos)

Sinais	Observações
Comportamento de medo/susto	Presença - Reação do animal (vacilo, salto) ao estalar de dedos
Exoftalmia	Presença - Protrusão dos globos oculares
Perda da força de agarramento	Presença - Quando colocado sobre uma grade de arame, o animal não move quando a grade é progressivamente movida em direção à posição vertical (cerca de 30°)
Comportamento de saltar	Presença
Perda de balanço*	Presença - Coordenação motora prejudicada. O animal cai de lado quando ele se move.
Pisada de pata dianteira*	Presença - Marcha repetida de patas dianteiras sem deslocamento
Marcha*	Presença - Coordenação motora preservada, mas animal ocasionalmente em desequilíbrio (cambaleando) - Locomoção na ponta das patas
Perda da coordenação motora*	Presença - Coordenação motora prejudicada - Locomoção desorganizada (por exemplo, cruzamento de patas)
Tônus alterado da musculatura abdominal	Aumento ou diminuição - Suavidade ou dureza do abdômen quando prensado lateralmente entre o dedo indicador e polegar em comparação ao grupo controle.
Contorções*	Presença - Contração coordenada dos músculos abdominais, geralmente resultando em flancos ocos e alongamento de membros posteriores
Perda de tração	Presença - Quando colocadas as patas dianteiras sobre a barra horizontal mais alta, o animal não traz suas patas traseiras para cima na tentativa de alcançar a barra horizontal mais baixa, alocada logo abaixo da primeira barra (máxima de três tentativas). *Se o animal apresentar tração normal, não é necessário verificar a força de agarramento, acinesia e catalepsia.

Sinais	Observações
Domínio sensório-motor	
Perda do reflexo da córnea	Presença - Quando a superfície da córnea é levemente tocada com a ponta de uma caneta, o animal não tem resposta de fechamento do olho
Perda do reflexo de endireitamento da postura	Presença - Quando colocado de costas, o animal não retorna à sua posição original
Domínio autonômico	
Piloereção*	Presença - Pelos arrepiados
Reflexo de retirada da pata/vocalização	Quando pinçado na ponta dos dedos de uma das patas traseiras com uma pinça, o animal não reage (movimentação de retirada ou vocalização)
Ptose	Presença Pálpebra parcialmente ou completamente fechada
Respiração alterada	Aumento ou diminuição - Taxa de respiração é comparada com o grupo controle
Defecação/diarreia	Presença: número de bolos fecais - Indicar presença de diarreia, se houver
Salivação	Presença - Umidade visível em torno da boca
Lacrimejamento	Presença - Umidade visível em torno dos olhos
Hipotermia	Três níveis baseados na temperatura média medida em animais tratados e controle: +: diminuição > 1°C ++: diminuição > 2°C +++: diminuição > 3°C
Hipertermia	Três níveis baseados na temperatura média medida em animais tratados e controle: +: aumento > 1°C ++: aumento > 2°C +++: aumento > 3°C

*Parâmetros avaliados continuamente nos primeiros 15 minutos após a administração.

Fonte: Adaptado de Castagné et al., 2013.

ANEXO IV - Validação do Teste de Irwin Modificado em Ratos



Estudo nº: 032-VAL-031-16

VALIDAÇÃO DO TESTE DE IRWIN MODIFICADO EM RATOS

RELATÓRIO FINAL

VALIDAÇÃO DO TESTE DE IRWIN MODIFICADO EM RATOS

Estudo nº: 032-VAL-031-16

Patrocinador: Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clinicos
Av. Luiz Boiteux Piazza, 1302
Florianópolis – SC
CEP: 88056-000

Página 1 de 36

Avenida Luiz Boiteux Piazza, 1302 Florianópolis – SC Brasil - CEP 88056-000

FARMACOLOGIA DE SEGURANÇA DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL: AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL EFEITO NEUROTÓXICO DA FOSFOETANOLAMINA (USP – São Carlos)

VALIDAÇÃO DO TESTE DE IRWIN MODIFICADO EM RATOS

SUMÁRIO

1. IDENTIFICAÇÃO	4
2. DECLARAÇÃO DE GARANTIA DA QUALIDADE	5
3. RESUMO E CONCLUSÃO	6
4. DATAS	7
5. OBJETIVOS DO ESTUDO	7
6. EQUIPE DE PROJETO	7
7. SUBSTÂNCIA TESTE, SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA, VEÍCULO, REAGENTES E SOLVENTES	7
7.1 Caracterização das Substâncias Teste	7
7.2 Caracterização do Veículo	8
7.3 Caracterização de Reagentes e Solventes	8
7.4 Preparação da Substância Teste, da Substância de Referência e do Veículo	9
7.5 Doses e vias de administração	9
7.6 Justificativa para a seleção das doses e vias de administração	9
8. SISTEMA TESTE	9
8.1 Justificativa para a seleção do Sistema Teste	9
8.2 Comitê de ética	9
8.3 Alojamento dos Animais	10
8.3.1 Biotério de Criação	10
8.3.2 Biotério de Manutenção	10
8.4 Identificação dos animais	10
9. ROBUSTEZ, RASTREABILIDADE, CONFIABILIDADE E REPRODUTIBILIDADE DOS RESULTADOS	11
10. PROCEDIMENTOS DO ESTUDO	11
10.1 Delineamento experimental	11
10.2 Metodologia	13
10.2.1 Ações pré-teste	13
10.2.2 Medida da temperatura corporal	14
10.2.3 Teste - Avaliações comportamentais e fisiológicas e sinais de neurotoxicidade	14
10.3 Grupos experimentais	16
10.4 Eutanásia	16
10.5 Análise de dados	16
11. RESULTADOS	17
11.1 Efeitos do Bromazepam	17

FARMACOLOGIA DE SEGURANÇA DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL: AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL EFEITO NEUROTÓXICO DA FOSFOETANOLAMINA (USP – São Carlos)

VALIDAÇÃO DO TESTE DE IRWIN MODIFICADO EM RATOS

11.1 Efeitos da Cafeína	21
11.3 Efeitos da Clorpromazina	25
12. CONCLUSÃO DO ESTUDO	29
13. REGISTRO DE DADOS BRUTOS	29
14. ARQUIVAMENTO	29
15. REFERÊNCIAS	29
15.1 Referências Internas	29
15.2 Normativas	30
15.3 Literatura	30
DECLARAÇÃO DO DIRETOR DE ESTUDO	32
DECLARAÇÃO DO GERENTE DA INSTALAÇÃO TESTE E DO DIRETOR PRESIDENTE	33

FARMACOLOGIA DE SEGURANÇA DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL: AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL EFEITO NEUROTÓXICO DA FOSFOETANOLAMINA (USP – São Carlos)



Estudo nº: 032-VAL-031-16

VALIDAÇÃO DO TESTE DE IRWIN MODIFICADO EM RATOS

1. IDENTIFICAÇÃO

Título do Estudo

VALIDAÇÃO DO TESTE DE IRWIN MODIFICADO EM RATOS

Número do Estudo

032-VAL-031-16

Patrocinador

Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clinicos
Av. Luiz Boiteux Piazza, 1302
Florianópolis – SC
CEP 88056-000

Instalação de Teste

Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clinicos
Av. Luiz Boiteux Piazza, 1302
Florianópolis – SC
Brasil
CEP 88056-000

Diretor Presidente

Dr. João Batista Calixto
Telefone: 48 32612856
E-mail: joao.calixto@ciemp.org.br
Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clinicos

Gerente da Instalação
de Teste

Dr. Jarbas Mota Siqueira Junior
Telefone: 48 32612856
E-mail: jarbas.siqueira@ciemp.org.br
Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clinicos

Diretor de Estudo

Dra. Edinéia Lemos de Andrade
Telefone: 48 32612856
E-mail: edineia.andrade@ciemp.org.br
Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clinicos

Diretor de Estudo
Substituto

Dr. Allisson Freire Bento
Telefone: 48 32612856
E-mail: allisson.bento@ciemp.org.br
Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clinicos

Unidade da Garantia da
Qualidade

Franciele Avila Silveira
Telefone: 48 32612856
E-mail: franciele.silveira@ciemp.org.br

FARMACOLOGIA DE SEGURANÇA DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL: AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL EFEITO NEUROTÓXICO DA FOSFOETANOLAMINA (USP – São Carlos)



Estudo nº: 032-VAL-031-16

VALIDAÇÃO DO TESTE DE IRWIN MODIFICADO EM RATOS

2. DECLARAÇÃO DE GARANTIA DA QUALIDADE

Declaro que o Relatório Final foi revisado e reflete os Dados Brutos.

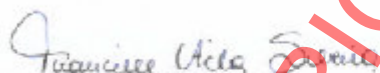
Declaro que foram realizadas auditorias, conforme descrito abaixo, não sendo observadas não conformidades que pudessem afetar a qualidade dos resultados.

Itens Auditados	Data da Auditoria	Data de relato ao DE*	Data de relato ao GIT*
Dados Brutos	24/10/2016	24/10/2016	24/10/2016
Relatório Final	24/10/2016	24/10/2016	24/10/2016

*DE: Diretor de Estudo; *GIT: Gerente da Instalação do Teste

Auditoria de estudo nº 032-VAL-031-16

Florianópolis, 24 de Outubro de 2016.


Franciele Avila Silveira

Coordenadora da Unidade de Garantia da Qualidade

3. RESUMO E CONCLUSÃO

O Teste de Irwin integra a bateria de testes pré-clínicos fundamentais para avaliação da Farmacologia de Segurança do sistema nervoso central (SNC), preconizada pelo guia ICH S7A (2000). Através deste é possível investigar o potencial efeito neurotóxico de substâncias por meio de uma série de avaliações comportamentais (observacionais e interativas). Os dados obtidos no Teste de Irwin podem ser agrupados em categorias relacionadas a efeitos sobre a atividade geral (excitação/sedação), comportamento motor/coordenação, modificação da resposta a estímulos e sinais autonômicos. O objetivo desse estudo foi padronizar e validar o ensaio de Irwin no CIEnP, utilizando substâncias cujo efeito neurológico é bem estabelecido. Para isso, ratos machos da linhagem "Sprague Dawley" (6 semanas de idade) foram tratados com Bromazepam (10 mg/kg, via intraperitoneal), Cafeína (24 mg/kg, via oral), Clorpromazina (30 mg/kg) ou Veículo (solução salina 1ml/kg) e avaliados nos tempos de 0-15; 15; 30; 60; 120; 180 minutos e 24 horas após os tratamentos. As alterações comportamentais, fisiológicas e sinais de neurotoxicidade foram registradas de acordo com uma grade de observação padrão descrita previamente por Irwin (1968) para camundongos e adaptada para ratos (Teste de Irwin modificado).

Os testes foram realizados em diferentes etapas, iniciando-se com avaliações dentro da caixa de habitação, seguido por avaliações realizadas durante a manipulação para a transferência do animal ao novo ambiente, avaliações no campo aberto durante um período de exploração e avaliações que incluem respostas do animal a diferentes estímulos utilizando aparatos.

Os resultados obtidos neste estudo mostram que o teste de Irwin modificado foi validado, visto que as Substâncias Teste Bromazepam, Cafeína e Clorpromazina, nas doses testadas, induziram alterações comportamentais, fisiológicas e sinais de neurotoxicidade de acordo com dados prévios da literatura.

VALIDAÇÃO DO TESTE DE IRWIN MODIFICADO EM RATOS

4. DATAS

Data do início do estudo: 15/08/2016

Data do início do ensaio: 15/08/2016

Data do término do ensaio: 30/08/2016

Data do término do estudo: 24/10/2016

5. OBJETIVOS DO ESTUDO

Validar o Teste de Irwin em ratos pela caracterização dos efeitos comportamentais, fisiológicos e neurotóxicos de diferentes substâncias cujos efeitos sobre o sistema nervoso central são bem estabelecidos na literatura.

6. EQUIPE DE PROJETO

Edineia Lemos Andrade, PhD	Diretora de estudo
Daniela Ferraz Pereira Leite, PhD	Coordenadora de Pesquisa Desenvolvimento e Inovação
Juliana Cavalli, PhD	Bolsista
Edir Rezende Junior, BsC	Técnico
Ana Carolina Luz Machado, BsC	Técnica

7. SUBSTÂNCIA TESTE, SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA, VEÍCULO, REAGENTES E SOLVENTES

7.1 Caracterização das Substâncias Teste

Nome	: Cafeína
Nome químico (IUPAC)	: 1,3,7-trimethylpurine-2,6-dione
Número do CAS	: 58-08-2
Lote	: BCBN9932V*
Data de fabricação	: 25/09/2016*
Data de validade	: 19/10/2018*
Pureza/Composição	: 98,5%*
Estabilidade	: não informada
Aspectos físicos	: pó branco*
Fabricante	: Sigma-Aldrich
Identificação CIEnP	: 032.2

*Dados fornecidos pelo fabricante

FARMACOLOGIA DE SEGURANÇA DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL: AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL EFEITO NEUROTÓXICO DA FOSFOETANOLAMINA (USP – São Carlos)

VALIDAÇÃO DO TESTE DE IRWIN MODIFICADO EM RATOS

Nome	: Cloridrato de Clorpromazina (Ampectil®)
Nome químico (IUPAC)	: 3-(2-chlorophenothiazin-10-yl)-N,N-dimethylpropan-1-amine;hydrochloride
Número do CAS	: 69-09-0
Lote	: 5V899*
Data de fabricação	: 14/07/2016*
Data de validade	: 31/08/2018*
Pureza/Composição	: solução oral 4%*
Estabilidade	: não se aplica
Aspectos físicos	: solução amarela/castanha*
Fabricante	: Sanofi-Aventis Farmacêutica Ltda
Identificação CIEnP	: 032-3
*Dados fornecidos pelo fabricante	
Nome	: Bromazepam (Somalium®)
Nome químico (IUPAC)	: 7-bromo-5-pyridin-2-yl-1,3-dihydro-1,4-benzodiazepin-2-one
Número do CAS	: 1812-30-2
Lote	: 16011464*
Data de fabricação	: 20/07/2016*
Data de validade	: 31/03/2018*
Pureza/Composição	: solução oral 2,5 mg/mL*
Estabilidade	: não informada
Aspectos físicos	: solução incolor*
Fabricante	: Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A.
Identificação CIEnP	: 032-1
*Dados fornecidos pelo fabricante	

7.2 Caracterização do Veículo

Nome	: Cloreto de sódio (NaCl) 0,9%
Lote	: 433275
Data de validade	: 02/2018
Pureza	: não se aplica
Fabricante	: Eurofarma Indústria Farmacêutica

7.3 Caracterização de Reagentes e Solventes

Nome	: Isoflurano
Lote	: 007727



Estudo nº: 032-VAL-031-16

VALIDAÇÃO DO TESTE DE IRWIN MODIFICADO EM RATOS

Data de validade : 11/2017
Fabricante : Instituto BioChimico Ind. Farm. Ltda

7.4 Preparação da Substância Teste, da Substância de Referência e do Veículo

As Substâncias Teste foram solubilizadas em solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,9%.

7.5 Doses e vias de administração

As doses das Substâncias Teste - Cafeína, Clorpromazina e Bromazepam utilizadas foram 24 mg/kg (via oral), 30 mg/kg (via oral) e 10 mg/kg (via intraperitoneal), respectivamente.

7.6 Justificativa para a seleção das doses e vias de administração

As doses das Substâncias Teste e vias de administração utilizadas foram definidas a partir de estudos da literatura (Rastogi et al., 1978; Lynch et al., 2011; Nsimba, 2009).

8. SISTEMA TESTE

Foram utilizados animais machos saudáveis da espécie *Rattus norvegicus* e linhagem "Sprague-Dawley", com idade de 6 semanas, provenientes do Biotério de Criação do CIEnP. Estes animais, cujas matrizes foram adquiridas da empresa Charles River (EUA), foram criados sob condições SPF "Specific Pathogen Free".

8.1 Justificativa para a seleção do Sistema Teste

Animais da espécie *Rattus norvegicus* e linhagem "Sprague Dawley" foram selecionados como sistema teste do presente estudo, por serem internacionalmente utilizados para testes de triagem de substâncias para avaliação do potencial neurotóxico (Moser et al., 1991). Além disso, são animais de fácil manejo.

8.2 Comitê de ética

Os procedimentos experimentais descritos neste relatório seguiram as normas dos Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de

Página 9 de 36

Avenida Luiz Boiteux Piazza, 1302 Florianópolis – SC Brasil - CEP 88056-000

VALIDAÇÃO DO TESTE DE IRWIN MODIFICADO EM RATOS

Experimentação Animal (CONCEA). O protocolo utilizado neste estudo foi revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Utilização Animal (CEUA) do CIEnP, sob o número 254/00. Os protocolos aprovados são mantidos em arquivos no CIEnP.

8.3 Alojamento dos Animais

Todas as gaiolas continham forração tipo maravalha (ASPEN – Lignocel®), material para nidificação (madeira Aspen) e um pequeno bloco de madeira Aspen como enriquecimento ambiental. A maravalha utilizada para a cama foi previamente autoclavada e renovada periodicamente para manter o ambiente seco e limpo. A temperatura das salas foi ajustada para 21 ± 2 °C com faixa de umidade de 40 - 70%. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12h, sendo o ciclo claro iniciado às 6:30 da manhã. Os animais receberam água e ração *ad libitum*, salvo possíveis exceções especificadas no item 10.2.1. A ração da marca Nuvital CR1® (Quintia, Colombo, Paraná, Brasil) é autoclavada, e a água, filtrada, clorada e embalada na máquina *Hydropac*® (Lab Products, Belcamp, Maryland, EUA). O CIEnP realiza mensalmente a avaliação de potabilidade da água fornecida aos animais.

8.3.1 Biotério de Criação

Os animais foram acondicionados no Biotério de Criação do CIEnP em caixas conectadas em racks microisoladoras fabricadas pela empresa Lab Products, medindo (LxCxA): 45x31x19 cm, com no máximo 5 animais por gaiola.

8.3.2 Biotério de Manutenção

Os animais utilizados neste estudo foram acondicionados no Biotério de Manutenção de roedores do CIEnP em gaiolas conectadas a racks microisoladoras da empresa ALESCO, medindo (LxCxA): 48,2 x 33,1 x 21,4 cm, com até 5 animais por gaiola e foram aclimatados por um período de, no mínimo, 5 dias.

8.4 Identificação dos animais

Cada gaiola foi identificada com uma etiqueta padrão os animais identificados individualmente através de marcação na cauda conforme o POP-E.10/versão atual.

9. ROBUSTEZ, RASTREABILIDADE, CONFIABILIDADE E REPRODUTIBILIDADE DOS RESULTADOS

Visando reduzir ao máximo desvios que pudessem interferir na confiabilidade, rastreabilidade e na reprodutibilidade dos resultados do estudo, foram empregados critérios alguns propostos pelo ARRIVE (do inglês, Animal Research Reporting In Vivo Experiments) (Kilkenny et al., 2010) e adotados pelos periódicos British Journal of Pharmacology (McGrath e Liley, 2015) e Biochemical Pharmacology (Mullane et al., 2015). Para isso, os seguintes procedimentos foram rigorosamente aplicados desde o planejamento experimental até a realização dos experimentos: 1) Nenhum dado foi omitido para efeito da análise dos resultados; 2) Os animais foram distribuídos aleatoriamente nos diferentes grupos experimentais; 3) Todos os reagentes foram obtidos de fornecedores credenciados pelo CIEnP e somente foram usados dentro do prazo de validade indicado pelo fabricante; 4) Todos os experimentos foram realizados de forma cega, ou seja, o experimentador não teve conhecimento prévio quanto ao tratamento dos animais (exceto o tratamento com o Veículo para efeito comparador); 5) O número de animais em cada grupo experimental foi o recomendado pela literatura (Lakings, 2010); 6) Os experimentos foram conduzidos em bloco (manhã e tarde) e tiveram todos os grupos experimentais representados a cada período experimental; 7) Todos dados brutos gerados foram pronta e imediatamente registrados pelo pessoal responsável pela condução do estudo e foram auditados pela UGQ.

10. PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

10.1 Delineamento experimental

O Teste de Irwin integra a bateria de testes fundamentais para avaliação da Farmacologia de Segurança do sistema nervoso central (SNC), preconizada pelo guia ICH S7A (2000). Através deste é possível investigar o potencial efeito neurotóxico de substâncias através de uma série de avaliações comportamentais (observacionais e interativas). No presente estudo foram selecionadas substâncias de diferentes classes farmacológicas cujos efeitos comportamentais e fisiológicos bem como neurotóxicos são bem estabelecidos, a fim de validar as observações realizadas ao longo do teste.

Para a realização do teste, no dia -1, os animais foram pesados, distribuídos nos diferentes grupos experimentais, depilados e mantidos na sala de experimentação para a ambientação (para detalhes ver item 10.2.1). No dia 0, a temperatura corporal basal foi

FARMACOLOGIA DE SEGURANÇA DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL: AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL EFEITO NEUROTÓXICO DA FOSFOETANOLAMINA (USP – São Carlos)

VALIDAÇÃO DO TESTE DE IRWIN MODIFICADO EM RATOS

mensurada e os tratamentos realizados. Os animais foram tratados com o Veículo (salina, 1 mL/kg, via oral), Bromazepam (10 mg/kg, via intraperitoneal), Cafeína (24 mg/kg, via oral) ou Clorpromazina (30 mg/kg, via oral). Os animais que receberam as Substâncias Teste foram avaliados pelo experimentador de maneira cega. No entanto, o grupo tratado com Veículo (controle negativo) foi identificado durante os testes, pois serviu como referência comportamental para avaliar as alterações induzidas pelas demais substâncias em cada período de avaliação.

Cada animal foi avaliado nos seguintes períodos: 0-15; 15; 30; 60; 120, 180 minutos e 24 horas após a administração como mostrado na Figura 1.

VALIDAÇÃO DO TESTE DE IRWIN MODIFICADO EM RATOS

Esquema do delineamento experimental

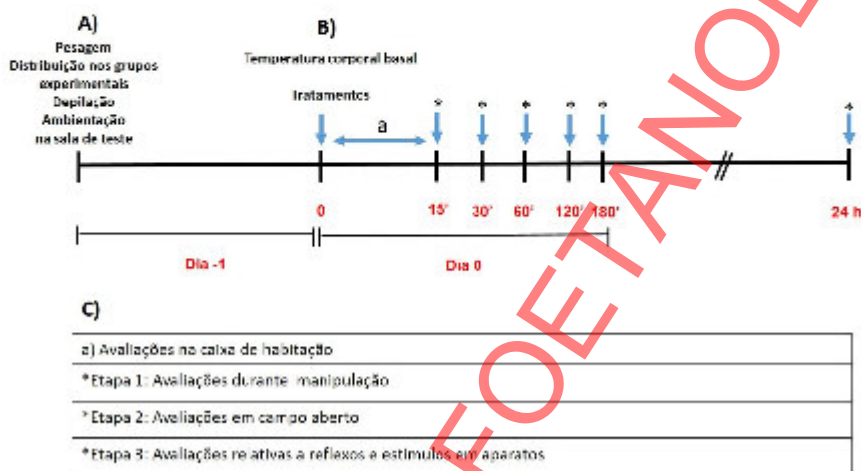


Figura 1: Desenho experimental para avaliação do efeito neurotóxico de diferentes Substâncias Teste utilizando o Teste de Irwin. (A) Pré-teste (dia -1): no dia anterior ao início do teste, os animais foram pesados, distribuídos nos grupos experimentais, depilados e ambientados na sala de experimentação. (B) Teste (dia 0): a temperatura corporal basal dos animais foi verificada e em seguida, no tempo 0, os animais receberam Veículo (salina, 1 mL/kg) ou as Substâncias Teste; Cafeína (24 mg/kg), Clorpromazina (30 mg/kg) pela via oral ou a Substância Teste Bromazepam (10 mg/kg) pela via intraperitoneal. Cada animal foi avaliado nos seguintes períodos: 0-15; 15; 30; 60; 120, 180 minutos e 24 horas após a administração. (C) Avaliações registradas: a ordem de testes progrediu do procedimento menos invasivo para o mais invasivo, ou seja, iniciando com as avaliações dentro da caixa de habitação (a) e medida da temperatura corporal no tempo de 0-15 min, seguido por um circuito de avaliações que consistiu de 3 etapas: etapa 1: avaliações realizadas durante a manipulação para a transferência ao novo ambiente; etapa 2: avaliações no campo aberto durante 3 minutos de período exploratório; etapa 3: avaliações que incluíram resposta a diferentes estímulos utilizando aparatos. Ao final da etapa 3, os animais retornaram à caixa de habitação. Todas as etapas deste circuito de avaliações foram completadas em cada período de avaliação (15; 30; 60; 120, 180 minutos e 24 horas).

10.2 Metodologia

10.2.1 Ações pré-teste

Inicialmente os animais foram identificados por marcação na cauda conforme POP-E.10/versão atual e pesados de acordo com os procedimentos descritos no POP.E.01/versão atual. Posteriormente os mesmos foram distribuídos em 4 grupos experimentais de forma que a variação de peso dos animais não excedeu $\pm 20\%$ do peso médio. Cada grupo experimental foi então aleatoriamente definido.

Todos os animais foram depilados na região do dorso sob anestesia com isoflurano 3 a 5% (concomitantemente com um fluxo corrente de oxigênio de 3 a 4 litros por minuto) para

VALIDAÇÃO DO TESTE DE IRWIN MODIFICADO EM RATOS

possibilitar a verificação da temperatura corporal. Posteriormente, os animais foram alocados na sala de teste para ambientação onde permaneceram entre 15-20h, com ração e água *ad libitum*, exceto no dia do teste, no qual a ração e a água foram removidas imediatamente antes do início dos tratamentos e recolocadas após o último período de avaliação do dia (180 minutos).

10.2.2 Medida da temperatura corporal

A temperatura corporal foi mensurada com auxílio de termômetro digital infravermelho (Morning Sun Electrical, modelo DT-8806C) direcionado ao dorso dos animais. A temperatura corporal média foi obtida a partir de três medidas consecutivas.

10.2.3 Teste - Avaliações comportamentais e fisiológicas e sinais de neurotoxicidade

As alterações comportamentais e fisiológicas e sinais de neurotoxicidade, bem como a temperatura corporal, foram registrados de acordo com uma grade padrão de observação (Anexo I).

Nos primeiros 15 minutos após os tratamentos, os animais foram avaliados dentro da sua própria caixa de habitação. Nesse período, a temperatura corporal foi mensurada e foram verificadas a postura do animal e a presença de comportamentos atípicos tais como convulsão, tremores, perda de coordenação motora, estereotipia, entre outros. Nos demais períodos de avaliação - 15, 30, 60, 120, 180 minutos e 24 horas após os tratamentos, os animais foram avaliados por uma série de etapas que constituiram um circuito, totalizando 6 circuitos para cada animal, como segue:

Etapa 1) avaliações realizadas durante a manipulação dos animais para a transferência a um novo ambiente: facilidade de remoção da caixa de habitação para o campo aberto, tônus muscular, salivação e lacrimejamento;

Etapa 2) avaliações realizadas no novo ambiente (campo aberto) durante 3 minutos de exploração: marcha anormal, perda de balanço, coordenação motora, entre outras;

Etapa 3) avaliações relativas a reflexos e estímulos em aparatos: reflexo da córnea, reatividade ao toque, tônus muscular, reflexo de endireitamento da postura, reflexo de retirada da pata/vocalização, tração, força de agarramento, acinesia e catalepsia.

Todas as etapas deste circuito foram completadas em cada período de avaliação. A avaliação ao longo do circuito levou em torno de 5 minutos para cada animal. Em cada bloco de experimento (manhã e tarde), um animal de cada grupo experimental foi analisado.

FARMACOLOGIA DE SEGURANÇA DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL: AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL EFEITO NEUROTÓXICO DA FOSFOETANOLAMINA (USP – São Carlos)

VALIDAÇÃO DO TESTE DE IRWIN MODIFICADO EM RATOS

Finalizadas todas as etapas, os animais retornaram à caixa de habitação. Ao início de um novo circuito (novo período de avaliação), ainda na caixa de habitação, a temperatura corporal foi novamente mensurada.

Para as avaliações realizadas durante a exploração em um novo ambiente foi utilizado o campo aberto, que consiste de uma caixa de acrílico medindo 60x40x22 cm. Para cada grupo experimental será utilizado um campo aberto individual. Para a avaliação da tração foi utilizado um aparato constituído por uma barra dupla fixada por dois suportes verticais (primeira barra 27x29 cm; segunda barra 27x40 cm; diâmetro de ambas as barras 0,4 cm). O aparato para a medida da força de agarramento e acinesia consistiu de uma grade de metal retangular (73x22 cm). Para medida do reflexo de retirada de retirada da pata/vocalização, foi utilizada uma pinça cirúrgica para, cuidadosamente, pinçar a ponta dos dedos de uma das patas traseiras do animal. O pinçamento foi realizado calmamente e com força progressiva, de modo a deflagrar uma resposta de remoção da pata ou vocalização.

VALIDAÇÃO DO TESTE DE IRWIN MODIFICADO EM RATOS

10.3 Grupos experimentais

Os animais foram separados em 4 diferentes grupos levando-se em consideração o peso corporal. Após este processo, os grupos experimentais descritos abaixo foram determinados aleatoriamente.

Tabela 1. Representação dos grupos experimentais, tratamento, periodicidade, dose, via de administração, volume de administração e número de animais por grupo experimental.

Grupos experimentais	Controle Negativo	Substância Teste 1	Substância Teste 2	Substância Teste 3
Tratamento	Veículo (Salina)	Bromazepam	Cafeína	Clorpromazina
Periodicidade	1 vez	1 vez	1 vez	1 vez
Dose	-	10 mg/kg	24 mg/kg	30 mg/kg
Via de Administração	Oral	Intraperitoneal	Oral	Oral
Volume de Administração	1 mL/kg	1 mL/kg	1 mL/kg	1 mL/kg
Animal por Grupo	8	7	8	8

10.4 Eutanásia

Ao final do protocolo os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂, conforme o POP E.11/versão atual - Eutanásia.

10.5 Análise de dados

Os dados foram representados como a presença do sinal clínico e/ou comportamento e foram apresentados na tabela de resultados como o número de animais apresentando determinado efeito (expresso como x/n, onde x é número de animais que apresentaram o efeito e n é a amostragem).

11. RESULTADOS

11.1 Efeitos do Bromazepam

O Bromazepam é um agente ansiolítico da classe dos benzodiazepínicos, capaz de produzir importantes alterações no SNC; alguns dos principais sintomas causados por essa droga são relevantes para o controle e aprendizagem motores, tais como indução do sono, relaxamento muscular e redução do estado de alerta (Michail et al., 2010).

No presente estudo, o tratamento dos animais com Bromazepam (10 mg/kg, via intraperitoneal) causou pronunciado efeito sedativo (15 a 120 minutos após administração), redução acentuada do tônus muscular (15 a 180 minutos), acompanhado de perda de balanço (0-15, 30, 120 e 180 minutos), perda da coordenação motora (30, 120 e 180 minutos), marcha anormal (0-15, 30, 120 e 180 minutos) e perda de tração (15 a 180 minutos). Além disso, o tratamento com Bromazepam reduziu a reatividade ao toque (15 a 180 minutos) bem como induziu catalepsia (15 a 120 minutos) e comportamento estereotipado (mastigação) (30 a 180 minutos). O tratamento com Bromazepam causou redução no número de animais que apresentaram defecação e micção durante as avaliações (15 a 60 minutos) em comparação ao grupo controle (Veículo). Estes achados estão de acordo com dados prévios demonstrando que o Bromazepam na mesma dose, causa supressão da atividade locomotora espontânea (Rastogi et al., 1978). Além disso, outro benzodiazepínico, o Diazepam, na dose de 8 mg/kg (via intraperitoneal), causa decréscimo na atividade geral e na reatividade ao toque, comportamento de medo/susto atenuado, tônus muscular reduzido, perda de tração, perda de balanço, perda da coordenação motora e número reduzido de animais apresentando defecação (Roux et al., 2004). Além disso, o Diazepam (8mg/kg, via oral) causa comportamento estereotipado (mastigação) (Castagné et al., 2013).

O quadro 2 apresenta todos os sinais clínicos e comportamentos observados após o tratamento com Bromazepam ao longo do tempo.

FARMACOLOGIA DE SEGURANÇA DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EFEITO NEUROTÓXICO DA FOSFOETANOLAMINA (USP – São Carlos)

VALIDAÇÃO DO TESTE DE IRWIN MODIFICADO EM RATOS

Quadro 2. Sinais clínicos e comportamentos observados no Teste de Irwin modificado após a administração de Bromazepam															
Dose e via		Veículo (salina, 1 mL/kg, via oral)							Bromazepam 10 mg/kg (via intraperitoneal)						
Parâmetros avaliados		Períodos de avaliação													
		0-15 m	15 m	30 m	60m	120 m	180 m	24 h	0-15 m	15 m	30 m	60m	120 m	180 m	24 h
Morte	Excitação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Convulsão		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tremor		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cauda de Straub		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Excitação discreta (+)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Excitação moderada (++)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Excitação pronunciada (+++)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Comportamento de saltar		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Reatividade ao toque aumentada		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Comportamento de medo/susto	-	4/8	5/8	7/8	2/8	2/8	-	-	-	-	-	-	-	-	
Tônus muscular aumentado	Sedação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5/7	-	-
Agressão		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Perda do reflexo de endireitamento da postura		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Perda do reflexo da córnea		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sedação discreta (+)		-	-	-	-	-	-	-	-	1/7	-	-	-	-	-
Sedação moderada (++)		-	-	-	-	-	-	-	-	2/7	4/7	1/7	4/7	-	-
Sedação pronunciada (+++)		-	-	-	-	-	-	-	-	3/7	3/7	6/7	3/7	-	-
Reatividade ao toque diminuída		-	-	-	-	-	-	-	-	5/7	6/7	7/7	6/7	7/7	-
Tônus muscular diminuído		-	-	-	-	-	-	-	-	5/7	7/7	6/7	-	4/7	-

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

FARMACOLOGIA DE SEGURANÇA DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EFEITO NEUROTÓXICO DA FOSFOETANOLAMINA (USP – São Carlos)



Estudo nº: 032-VAL-031-16

VALIDAÇÃO DO TESTE DE IRWIN MODIFICADO EM RATOS

Quadro 2. Continuação

Pisada de pata dianteira	Estereotípia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Contorções de cabeça		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Estereotípia (comportamento de farejar)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Estereotípia (mastigação)		-	-	-	-	-	-	-	-	1/7	1/7	1/7	1/7	1/7	-
Estereotípia (movimentos de cabeça atípicos)		-	-	-	-	-	-	1/7	-	-	-	-	-	-	-
Comportamento de coçar		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalepsia	Motor	-	-	-	-	-	-	-	5/7	3/7	4/7	2/7	-	-	-
Acinesia		-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/7	-	-	-	-
Perda da coordenação motora (cruzamento de patas)		-	-	-	-	-	-	-	2/7	1/7	-	1/7	2/7	-	-
Perda de balanço (cambaleiar e cair)		-	-	-	-	-	-	-	2/7	-	4/7	-	3/7	3/7	-
Marcha anormal: locomoção na ponta das patas		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Marcha anormal: desequilíbrio (cambaleiar sem cair)		-	-	-	-	-	-	-	4/7	3/7	4/7	-	4/7	5/7	-
Perda de tração		-	-	-	-	-	-	-	-	6/7	6/7	6/7	5/7	4/7	-
Perda da força de agarramento		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Reflexo de retirada da pata/vocalização	Nociceção	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ptose	Autonômico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/7	-	-	-
Exoftalmia		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Piloereção		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Defecação		-	6/8	3/8	1/8	1/8	1/8	5/8	-	-	-	-	-	1/7	6/7
Micção		-	1/8	-	1/8	3/8	-	2/8	-	-	-	-	1/7	1/7	1/7
Salivação		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lacrimejamento		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

FARMACOLOGIA DE SEGURANÇA DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EFEITO NEUROTÓXICO DA FOSFOETANOLAMINA (USP – São Carlos)



Estudo nº: 032-VAL-031-16

VALIDAÇÃO DO TESTE DE IRWIN MODIFICADO EM RATOS

[illegible]

Os dados são apresentados como o número de animais apresentando os sinais clínicos e/ou comportamentos durante o teste. (x/n) indica o número de animais apresentando os sinais clínicos/comportamentos na amostragem. As observações foram realizadas nos seguintes períodos: 0-15, 15, 30, 60, 120 e 180 minutos e 24 horas após o tratamento.

11.1 Efeitos da Cafeína

A Cafeína é um agente da classe das metilxantinas, que pode induzir vários sintomas clínicos, desde nervosismo, irritabilidade, insônia e distúrbios sensoriais, diurese, arritmia, taquicardia, frequência respiratória aumentada e distúrbios gastrointestinais (Stavric, 1988).

O tratamento dos animais com Cafeína (24 mg/kg, via oral) causou excitação pronunciada (15 a 180 minutos) e comportamento de medo/susto exacerbado nos períodos 15 a 120 minutos, porém discreto em 180 minutos. Além disso, foi observado aumento da reatividade ao toque (15 a 180 minutos) e da frequência respiratória (pronunciado nos períodos de 15 a 120 minutos e discreto no período de 180 minutos). Esses dados corroboram com os dados da literatura os quais mostram que a Cafeína (24 mg/kg, via oral) causa aumento da atividade geral, do comportamento de medo/fuga bem como da taxa respiratória (Lynch et al., 2011). Entretanto, diferentemente dos dados obtidos no presente estudo, Lynch e colaboradores (2011) observaram que a Cafeína (24 mg/kg, via oral) causa estereotipias (comportamento de farejar, movimentos de cabeça, contorções de cabeça).

O Quadro 3 apresenta todos os sinais clínicos e comportamentos observados após o tratamento com Cafeína ao longo do tempo.

FARMACOLOGIA DE SEGURANÇA DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EFEITO NEUROTÓXICO DA FOSFOETANOLAMINA (USP – São Carlos)

VALIDAÇÃO DO TESTE DE IRWIN MODIFICADO EM RATOS

Quadro 3. Sinais clínicos e comportamentos observados no Teste de Irwin modificado após a administração de Cafeína															
Dose e via		Veículo (salina, 1 mL/kg, via oral)							Cafeína 24 mg/kg (via oral)						
Parâmetros avaliados		Períodos de avaliação													
		0-15 m	15 m	30 m	60m	120 m	180 m	24 h	0-15 m	15 m	30 m	60m	120 m	180 m	24 h
Morte	Excitação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Convulsão		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tremor		-	-	-	-	-	-	-	1/7	-	-	-	-	-	-
Cauda de Straub		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Excitação discreta (+)		-	-	-	-	-	-	-	-	3/8	5/8	3/8	6/8	6/8	-
Excitação moderada (++)		-	-	-	-	-	-	-	-	4/8	2/8	5/8	2/8	2/8	-
Excitação pronunciada (+++)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/8	-	-	-	-
Comportamento de saltar		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Reatividade ao toque aumentada		-	-	-	-	-	-	-	-	6/8	5/8	4/8	3/8	3/8	-
Comportamento de medo/susto		-	4/8	5/8	7/8	2/8	2/8	-	-	-	5/8	7/8	4/8	3/8	-
Tônus muscular aumentado	Sedação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Agressão		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Perda do reflexo de endireitamento da postura		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Perda do reflexo da córnea		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Sedação discreta (+)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Sedação moderada (++)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Sedação pronunciada (+++)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Reatividade ao toque diminuída		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Comportamento de medo/susto diminuído		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Tônus muscular diminuído		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

FARMACOLOGIA DE SEGURANÇA DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EFEITO NEUROTÓXICO DA FOSFOETANOLAMINA (USP – São Carlos)



Estudo nº: 032-VAL-031-16

VALIDAÇÃO DO TESTE DE IRWIN MODIFICADO EM RATOS

Quadro 3. Continuação

Pisada de pata dianteira	Estereotípi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Contorções de cabeça		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Estereotípi (comportamento de farejar)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Estereotípi (mastigação)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Estereotípi (movimentos de cabeça atípicos)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Comportamento de coçar		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalepsia	Motor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acinesia		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Descoordenação motora (cruzamento de patas)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Perda de balanço (cambaleio e cair)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Marcha anormal: locomoção na ponta das patas		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Marcha anormal: desequilíbrio (cambaleio sem cair)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Perda de tração	Nocepcão	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Perda da força de agarramento		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Reflexo de retirada da pata/vocalização		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ptose		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Exoftalmia		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Piloereção		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Defecação	Autonômico	-	6/8	3/8	1/8	1/8	1/8	5/8	-	6/8	-	3/8	4/8	1/8	3/8
Micção		-	1/8	-	1/8	3/8	-	2/8	-	2/8	-	-	-	1/8	2/8
Salivação		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lacrimagem		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

FARMACOLOGIA DE SEGURANÇA DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EFEITO NEUROTÓXICO DA FOSFOETANOLAMINA (USP – São Carlos)



Estudo nº: 032-VAL-031-16

VALIDAÇÃO DO TESTE DE IRWIN MODIFICADO EM RATOS

Quadro 3. Continuação

Respiração aumentada	-	-	-	-	-	-	-	-	5/8	8/8	8/8	7/8	7/8	1/8
Respiração diminuída	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hipotermia +: diminuição > 1°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hipotermia ++: diminuição > 2°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hipotermia +++: diminuição > 3°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hipertermia +: aumento > 1°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hipertermia ++: aumento > 2°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hipertermia +++: aumento > 3°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Os dados são apresentados como o número de animais apresentando os sinais clínicos e/ou comportamentos durante o teste. (x/n) indica o número de animais apresentando os sinais clínicos/comportamentos na amostragem. As observações foram realizadas nos seguintes períodos: 0-15, 15, 30, 60, 120 e 180 minutos e 24 horas após o tratamento.

11.3 Efeitos da Clorpromazina

A Clorpromazina, é um típico agente antipsicótico do grupo das fenotiazinas, amplamente usado para o tratamento de sintomas psicóticos (Thornley et al., 2000). Os efeitos adversos mais comuns incluem problemas motores, sonolência, boca seca, hipotensão postural e ganho de peso. Os efeitos secundários graves incluem discinesia, síndrome maligna neuroleptica e diminuição dos níveis de leucócitos (The American Society of Health-System Pharmacists, 2015).

Os animais tratados com Clorpromazina (30 mg/kg, via oral) apresentaram redução da atividade geral (30-180 minutos e 24 horas), da reatividade ao toque (15 a 180 minutos e 24 horas), comportamento de medo/susto atenuado (presença do comportamento somente 1 animal de 8 animais no período de 60 minutos e em 2 animais de 8 animais no período de 24 horas), tônus muscular reduzido (120 e 180 minutos e 24 horas), bem como perda de tração (120 e 180 minutos e 24 horas). Além disso, os animais tratados com Clorpromazina apresentaram comportamento estereotipado (0-15 minutos) e ptose (30 a 180 minutos e 24 horas). De fato, os dados da literatura mostram que a Clorpromazina (16 mg/kg, via oral) causa diminuição da atividade geral, do tônus muscular e do comportamento de medo/susto (Lynch et al., 2011). No entanto, Lynch e colaboradores (2011) observaram comportamento estereotipado (movimentos de cabeça e comportamento de farejar) somente quando os animais são tratados com Clorpromazina (4 mg/kg, via oral).

O quadro 4 apresenta todos os sinais clínicos e comportamentos observados após o tratamento com Clorpromazina ao longo do tempo.

FARMACOLOGIA DE SEGURANÇA DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EFEITO NEUROTÓXICO DA FOSFOETANOLAMINA (USP – São Carlos)

VALIDAÇÃO DO TESTE DE IRWIN MODIFICADO EM RATOS

Quadro 4. Sinais clínicos e comportamentos observados no Teste de Irwin modificado após a administração de Clorpromazina															
Dose e via		Veículo (salina, 1 mL/kg, via oral)							Clorpromazina 30 mg/kg (via oral)						
Parâmetros avaliados		Períodos de avaliação													
		0-15 m	15 m	30 m	60m	120 m	180 m	24 h	0-15 m	15 m	30 m	60m	120 m	180 m	24 h
Morte	Excitação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Convulsão		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tremor		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cauda de Straub		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Excitação discreta (+)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Excitação moderada (++)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Excitação pronunciada (+++)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Comportamento de saltar		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Reatividade ao toque aumentada		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Comportamento de medo/susto	-	4/8	5/8	7/8	2/8	2/8	-	-	-	-	1/8	-	-	2/8	
Tônus muscular aumentado	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Agressão	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Perda do reflexo de endireitamento da postura	Sedação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Perda do reflexo da córnea		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Sedação discreta (+)		-	-	-	-	-	-	-	-	3/8	5/8	-	1/8	-	
Sedação moderada (++)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/8	-	-	-	
Sedação pronunciada (+++)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/8	7/8	7/8	8/8	
Reatividade ao toque diminuída		-	-	-	-	-	-	-	-	4/8	4/8	7/8	7/8	8/8	
Tônus muscular diminuído		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/8	1/8	
Quadro 4. Continuação		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

FARMACOLOGIA DE SEGURANÇA DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EFEITO NEUROTÓXICO DA FOSFOETANOLAMINA (USP – São Carlos)



Estudo nº: 032-VAL-031-16

VALIDAÇÃO DO TESTE DE IRWIN MODIFICADO EM RATOS

Pisada de pata dianteira	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Contorções de cabeça	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Estereotipia (comportamento de farejar)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Estereotipia (mastigação)	-	-	-	-	-	-	-	4/8	-	-	-	-	-	-
Estereotipia (movimentos de cabeça atípicos)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Comportamento de coçar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalepsia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acinesia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Descoordenação motora (cruzamento de patas)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Perda de balanço (cambaleiar e cair)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Marcha anormal: locomoção na ponta das patas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Marcha anormal: desequilíbrio (cambaleiar sem cair)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Perda de tração	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/8	1/8	1/8
Perda da força de agarramento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Reflexo de retirada da pata/vocalização	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ptose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6/8	-	8/8	3/8
Exoftalmia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Piloereção	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Defecação	-	6/8	3/8	1/8	1/8	1/8	5/8	-	6/8	1/8	-	-	-	6/8
Micção	-	1/8	-	1/8	3/8	-	2/8	-	3/8	1/8	1/8	1/8	-	5/8
Salivação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lacrimejamento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

FARMACOLOGIA DE SEGURANÇA DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EFEITO NEUROTÓXICO DA FOSFOETANOLAMINA (USP – São Carlos)



Estudo nº: 032-VAL-031-16

VALIDAÇÃO DO TESTE DE IRWIN MODIFICADO EM RATOS

Quadro 4. Continuação

Respiração aumentada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3/8	1/8	-	-	-	-
Respiração diminuída	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hipotermia ++: diminuição > 1°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hipotermia ++: diminuição > 2°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hipotermia +++: diminuição > 3°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hipertermia ++: aumento > 1°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hipertermia ++: aumento > 2°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hipertermia +++: aumento > 3°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Os dados são apresentados como o número de animais apresentando os sinais clínicos e/ou comportamentos durante o teste. (x/n) indica o número de animais apresentando os sinais clínicos/comportamentos na amostragem. As observações foram realizadas nos seguintes períodos: 0-15, 15, 30, 60, 120 e 180 minutos e 24 horas após o tratamento.

VALIDAÇÃO DO TESTE DE IRWIN MODIFICADO EM RATOS

12. CONCLUSÃO DO ESTUDO

Os resultados obtidos neste estudo mostram que o teste de Irwin modificado foi validado, tendo em vista que as diferentes Substâncias Teste Bromazepam, Cafeína e Clorpromazina, quando administradas sistemicamente aos animais induziram alterações comportamentais e fisiológicas e sinais de neurotoxicidade conforme resultados prévios da literatura. Assim, o teste de Irwin modificado poderá ser utilizado em estudos posteriores para avaliação da Farmacologia de Segurança de novas substâncias sobre o SNC.

13. REGISTRO DE DADOS BRUTOS

Todos os dados brutos e observações relacionadas ao estudo foram registrados em formulário e/ou planilhas adequadas.

14. ARQUIVAMENTO

Uma cópia original dos Dados Brutos e Relatório Final serão arquivados por, no mínimo, 5 anos no CIEnP.

15. REFERÊNCIAS

15.1 Referências Internas

POP-B07/versão atual: Arquivo, recuperação e disposição de documentos;
POP-E01/versão atual: Pesagem de animais;
POP-E02/versão atual: Vias de administração;
POP-E.04/versão atual: Randomização de animais e separação de grupos experimentais;
POP-E.10/versão atual: Identificação de animais para estudos;
POP-E.11/versão atual: Eutanásia de animais;
POP-E.12/versão atual: Manipulação e contenção de animais;
POP-E.13/versão atual: Recebimento de animais;
POP-E.15/versão atual: Solicitação, acondicionamento e manuseio dos animais.

15.2 Normativas

ICH S7A: Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals, 2000.

Guia Brasileiro de Boas Práticas em Eutanásia em Animais - Conceitos e Procedimentos Recomendados. Conselho Federal de medicina Veterinária (CFMV), Brasília, 2013.

15.3 Literatura

Castagné V, Froger-Colléux C, Esneault E, Hemier AM, Lemaire M, Porsolt RD. Central Nervous System (CNS) Safety Pharmacology Studies. In Vogel HA, editors. Drug Discovery and Evaluation: Safety and Pharmacokinetic Assays. Berlin: Springer-Verlag, 2013, p.17-72.

Irwin S. Comprehensive behavioral assessment: 1a A systematic quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. Psychopharmacologia 13:222-57, 1968.

Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Animal research: reporting in vivo experiments: The ARRIVE guidelines. PLoS Biol. 8 (6): e1000412, 2010.

Lakings DB. Nonclinical Safety Pharmacology Studies Recommended for Support of First-in-Human Trials Clinical Trials. In: Mitchell NC, editor. Early Drug Development: Strategies and Routes to First-in-Human Trials. John Wiley and Sons, Inc., 2010. p.249-280.

Lynch JJ 3rd, Castagné V, Moser PC, Mittelstadt SW. Comparison of methods for the assessment of locomotor activity in rodent safety pharmacology studies. J Pharmacol Toxicol Methods 64(1):74-80, 2011.

McGrath JC, Lilley E. Implementing guidelines on reporting research using animals (ARRIVE etc.): new requirements for publication in BJP. Br J Pharmacol. 172 (13):3189-93, 2015.

Michail E, Chouvarda I, Maglaveras N. Benzodiazepine administration effect on EEG fractal dimension: results and causalities. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc. 2350-3, 2010.

FARMACOLOGIA DE SEGURANÇA DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL: AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL EFEITO NEUROTÓXICO DA FOSFOETANOLAMINA (USP – São Carlos)

VALIDAÇÃO DO TESTE DE IRWIN MODIFICADO EM RATOS

Mullane K, Enna SJ, Piette J, Williams M. Guidelines for manuscript submission in the peer-reviewed pharmacological literature. *Biochemical Pharmacology*, 97:225-35, 2015.

Nsimba SE. Effects of daily chlorpromazine administration on behavioural and physiological parameters in the rat. *Indian J Physiol Pharmacol*. 53(3):209-18, 2009.

Rastogi RB, Lapierre YD, Singhal. Effect of new benzodiazepine bromazepam on locomotor performance and brain monoamine and metabolism. *J Neural Transm*. 42(4):251-61, 1978.

Roux S, Sablé E, Porsolt RD. Primary observation (Irwin) test in rodents for assessing acute toxicity of a test agent and its effects on behavior and physiological function. *Curr Protoc Pharmacol*. Chapter 10:Unit 10.10, 2005.

Stavric B. Methylxanthines: toxicity to humans. 2. Caffeine. *Food Chem Toxicol*. 26(7):645-62, 1988.

The American Society of Health-System Pharmacists. Chlorpromazine Hydrochloride, 2015.

Thornley B, Adams CE, Awad G. Chlorpromazine versus placebo for schizophrenia. *Cochrane Database Syst Rev*. (2) CD000284, 2000.

FARMACOLOGIA DE SEGURANÇA DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL: AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL EFEITO NEUROTÓXICO DA FOSFOETANOLAMINA (USP – São Carlos)



Estudo nº: 032-VAL-031-16

VALIDAÇÃO DO TESTE DE IRWIN MODIFICADO EM RATOS

DECLARAÇÃO DO DIRETOR DE ESTUDO

Eu, abaixo assinado, declaro que este estudo foi realizado sob a minha supervisão, conforme os procedimentos nele descritos. Os resultados apresentados referem-se às Substâncias Teste utilizadas.


Dra Edinéia Lemos de Andrade
Diretor do Estudo

24/10/16
Data

Página 32 de 36

Avenida Luiz Boiteux Piazza, 1302 Florianópolis – SC Brasil - CEP 88056-000

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

FARMACOLOGIA DE SEGURANÇA DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL: AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL EFEITO NEUROTÓXICO DA FOSFOETANOLAMINA (USP – São Carlos)



Estudo nº: 032-VAL-031-16

VALIDAÇÃO DO TESTE DE IRWIN MODIFICADO EM RATOS

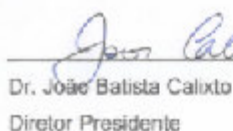
DECLARAÇÃO DO GERENTE DA INSTALAÇÃO TESTE E DO DIRETOR PRESIDENTE

Nós, abaixo assinados, declaramos que este estudo representa o registro preciso e verdadeiro dos resultados obtidos.

Este documento não deve ser reproduzido parcialmente.


Dr. Jarbas Mota Siqueira Junior
Gerente da Instalação Teste

24/10/2016
Data


Dr. João Batista Calixto
Diretor Presidente

24/10/2016
Data

Página 33 de 36

Avenida Luiz Boiteux Piazza, 1302 Florianópolis – SC Brasil - CEP 88056-000

RELATÓRIO FOSFOETANOLAMINA

FARMACOLOGIA DE SEGURANÇA DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EFEITO NEUROTÓXICO DA FOSFOETANOLAMINA (USP – São Carlos)

VALIDAÇÃO DO TESTE DE IRWIN MODIFICADO EM RATOS

ANEXO I

Quadro 1. Grade padrão para registro de sinais clínicos observados no Teste de Irwin modificado	
Sinais	Observações
Domínio Comportamental	
Reatividade ao toque	Aumento ou diminuição - Reação de fuga do animal à pressão dos dedos para baixo no quarto traseiro em comparação ao grupo controle
Sedação	Três intensidades: +: após retirada da caixa e manipulação, o animal move-se mais lentamente em comparação ao animal do grupo controle ++: sob as mesmas condições, o animal move-se muito lentamente +++: sob as mesmas condições, o animal não se move
Excitação	Três intensidades: +: após retirada da caixa e manipulação, o animal é discretamente mais ativo que o animal do grupo controle ++: sob as mesmas condições, o animal move-se rapidamente +++: sob as mesmas condições, o animal se move muito rapidamente
Catalepsia	Presença - Quando colocado em "posição de Buda", o animal não se move
Morte*	Presença Indicar o tempo de morte se menor que 15 minutos
Convulsão*	Presença Indicar o tempo de surgimento se menor que 15 minutos
Estereotipia*	Presença - Movimentos repetidos anormais: comportamento de farejar, mastigação, movimentos de cabeça atípicos
Contorções de cabeça*	-Presença Movimento rápido axial de um lado para outro da cabeça
Comportamento de coceira*	-Presença Coceira com as patas dianteiras ou traseiras em qualquer parte do corpo
Agressão	Presença - Tentativa de mordida quando há aproximação de uma caneta em direção à cabeça - Tentativa de mordida em direção a outros animais ou ao experimentador
Tremor*	Presença Tremor corporal disseminado ou em parte do corpo
Cauda de Straub*	Presença Cauda rígida na posição vertical e tendência do animal em curvar o dorso

FARMACOLOGIA DE SEGURANÇA DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EFEITO NEUROTÓXICO DA FOSFOETANOLAMINA (USP – São Carlos)

VALIDAÇÃO DO TESTE DE IRWIN MODIFICADO EM RATOS

Sinais	Observações
Comportamento de medo/susto	Presença - Reação do animal (vacilo, salto) ao estalar de dedos
Exoftalmia	Presença - Protrusão dos globos oculares
Perda da força de agarramento	Presença - Quando colocado sobre uma grade de arame, o animal não move quando a grade é progressivamente movida em direção à posição vertical (cerca de 30°)
Comportamento de saltar	Presença
Perda de balanço*	Presença - Coordenação motora prejudicada. O animal cai de lado quando ele se move.
Pisada de pata dianteira*	Presença - Marcha repetida de patas dianteiras sem deslocamento
Marcha*	Presença - Coordenação motora preservada, mas animal ocasionalmente em desequilíbrio (cambaleando) - Locomoção na ponta das patas
Perda de coordenação motora*	Presença - Coordenação motora prejudicada - Locomoção desorganizada (por exemplo, cruzamento de patas)
Tônus alterado da musculatura abdominal	Aumento ou diminuição - Suavidade ou dureza do abdômen quando prensado lateralmente entre o dedo indicador e polegar em comparação ao grupo controle.
Contorções*	Presença - Contração coordenada dos músculos abdominais, geralmente resultando em flancos ociosos e alongamento de membros posteriores
Perda de tração	Presença - Quando colocadas as patas dianteiras sobre a barra horizontal mais alta, o animal não traz suas patas traseiras para cima na tentativa de alcançar a barra horizontal mais baixa, alocada logo abaixo da primeira barra (máxima de três tentativas). *Se o animal apresenta tração normal, não é necessário verificar a força de agarramento, acinesia e catalepsia.

FARMACOLOGIA DE SEGURANÇA DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EFEITO NEUROTÓXICO DA FOSFOETANOLAMINA (USP – São Carlos)

VALIDAÇÃO DO TESTE DE IRWIN MODIFICADO EM RATOS

Sinais	Observações
Domínio sensório-motor	
Perda do reflexo da córnea	Presença - Quando a superfície da córnea é levemente tocada com a ponta de uma caneta, o animal não tem resposta de fechamento do olho
Perda do reflexo de endireitamento da postura	Presença - Quando colocado de costas, o animal não retorna à sua posição original
Domínio autonômico	
Piloereção*	Presença - Pelos arrepiados
Reflexo de retirada da pata/vocalização	Quando pinçado na ponta dos dedos de uma das patas traseiras com uma pinça, o animal não reage (movimentação de retirada ou vocalização)
Ptose	Presença Pálpebra parcialmente ou completamente fechada
Respiração alterada	Aumento ou diminuição - Taxa de respiração é comparada com o grupo controle
Defecação/diarreia	Presença: número de bolos fecais - Indicar presença de diarreia, se houver
Micção	Presença: número de pontos (áreas) de urina
Salivação	Presença - Umidade visível em torno da boca
Lacrimejamento	Presença - Umidade visível em torno dos olhos
Hipotermia	Três níveis baseados na temperatura média medida em animais tratados e controle: +: diminuição > 1°C ++: diminuição > 2°C +++: diminuição > 3°C
Hipertermia	Três níveis baseados na temperatura média medida em animais tratados e controle: +: aumento > 1°C ++: aumento > 2°C +++: aumento > 3°C

*Parâmetros avaliados continuamente nos primeiros 15 minutos após a administração.

Fonte: Adaptado de Castagné et al., 2013.