

# AValiação DO EFEITO CUMULATIVO DO ANTIMONIATO DE MEGlumINA SOBRE A PROLE DE CAMUNDONGOS SWISS: ENSAIO BIOLóGICO

MICHELLE RODRIGUES DOS SANTOS, CLARISSE JULIANA KRIGNL, ALEXANDRA NAVA, CAMILA MICHELE SABEDOT REIK, FABIANA ERNESTINA BARCELLOS DA SILVA, SILVANE SOUZA ROMAN\*

Trabalho realizado na Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus de Erechim, Erechim, RS

## RESUMO

**OBJETIVOS.** Avaliar o efeito do antimoniato de meglumina na transferência materno-fetal na geração F1 (prole de matrizes expostas ao composto), e conseqüências em progênies F2.

**MÉTODOS.** Camundongos fêmeas Swiss foram tratados com antimoniato de meglumina, via subcutânea, com administração diária, do sétimo ao 12º dia de gestação (ddg), na dose equivalente a 100mgSb<sup>v</sup>/kg peso/dia. O grupo controle recebeu apenas o veículo (água destilada). Após o nascimento da prole (geração F1), 59 fêmeas foram examinadas diariamente para determinação do ciclo estral. Quando determinado o ciclo estro, acasalou-se 18 fêmeas com machos da mesma linhagem. No 18º ddg, as fêmeas foram eutanasiadas por câmara de CO<sub>2</sub>, o abdômen incisado e o útero exposto, quando avaliou-se os sítios de desenvolvimento embrionário e fetal quanto ao número de reabsorções, fetos vivos e mortos. Todos os fetos e placentas foram pesados para calcular o índice placentário. Três placentas de cada ninhada foram separadas para análise microscópica.

**RESULTADOS.** A exposição ao antimoniato de meglumina não interferiu no ciclo estral dos animais tratados, pelo fato de não alterar o intervalo precoal e o índice de fertilidade. Não foram observadas alterações placentárias em progênies F2.

**CONCLUSÃO.** O antimoniato de meglumina não altera a performance reprodutiva das mães expostas cronicamente. Estes dados sugerem que ocorre uma gradual eliminação do antimoniato de meglumina no organismo materno, sem acarretar danos a proles futuras.

UNITERMOS: Meglumina. Camundongos. Teratogênios. Anticoncepção.

## \*Correspondência

Curso de Farmácia,  
URI - Campus de Erechim  
Avenida Sete de Setembro,  
1621  
Erechim - RS  
Cep: 99700-000  
Tel: (54) 3520-9000  
Ramal: 9073  
Fax: (54) 3520-9090  
roman@uri.com.br

## INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença de evolução crônica, causada por parasitas protozoários<sup>1</sup>, que pode ocorrer na pele, nas membranas mucosas ou nas vísceras. A leishmaniose cutânea acomete cerca de 300 mil a 400 mil pessoas no mundo a cada ano, constituindo um problema na área de saúde pública em diversos países<sup>2</sup>. Os antimoniais pentavalentes permanecem como a base terapêutica e por causa da ocorrência de casos que não responderam aos esquemas descontínuos ou seriados de antimoniais buscou-se aplicá-los em esquemas ininterruptos<sup>3</sup>, mesmo apresentando toxicidade, efeitos colaterais e alto custo<sup>4</sup>. Sua introdução foi baseada em conceitos terapêuticos do século XIX, quando era significativa a participação terapêutica de sais de metais, como arsênio e outros<sup>5</sup>.

O antimônio acumula-se, em geral, em órgãos vascularizados e tecidos, principalmente rins e fígado, além de possuir grande afinidade pelo baço e pelo sangue<sup>6</sup>. Verificou-se através da análise da função renal de 11 pacientes com leishmaniose cutâneo-mucosa, tratados com antimônio pentavalente na dose de 40mg Sb<sup>v</sup>/kg/dia aplicada de 12/12 horas, em esquema contínuo, durante 30 dias, um acúmulo no fígado e nos rins, levando à hepatomegalia, sendo este um sintoma típico de intoxicação crônica por antimônio<sup>7</sup>. O antimônio ainda pode ser detectado no cabelo de um paciente tratado com antimoniais pentavalentes

após um ano do término do tratamento<sup>8</sup>. Por isso, a Organização Mundial da Saúde preconiza que as doses de antimoniais não devem ultrapassar 20mg/kg/dia, limitando-se a 850mg de antimônio, devido a sua alta toxicidade<sup>9</sup>.

De acordo com a literatura, o número de mulheres gestantes com leishmanioses, principalmente a forma visceral, tornam-se mais freqüentes. Estudos nesse grupo, em especial, ainda são escassos e existem controvérsias sobre a segurança da administração de antimoniato de meglumina durante o período gestacional<sup>10</sup>.

O antimônio pentavalente, administrado repetidamente em ratos na dose de 300mgSb<sup>v</sup>/kg do sexto ao 15º dia de gestação, induziu a embriofetalidade e a anomalias do esqueleto, sugerindo que a possível toxicidade foi resultante do acúmulo gradual de Sb<sup>v</sup> nos tecidos maternos e embrionários<sup>11</sup>. Esse acúmulo gradual foi demonstrado na avaliação da cinética do antimoniato de meglumina no organismo materno e fetal de ratos, demonstrado através da passagem transplacentária de antimoniato de meglumina em fetos removidos por cesariana no 21º ddg, 24 horas após a última dose administrada<sup>12</sup>.

Krignill<sup>15</sup> administrou 100mgSb<sup>v</sup>/kg/dia de antimoniato de meglumina em camundongos Swiss, via subcutânea, do sétimo ao 12º dia de gestação e, logo após o nascimento da prole, foi avaliado o desenvolvimento físico e neuromotor da prole. Foi observado que o

antimoniato de meglumina não interferiu no desenvolvimento físico e neuromotor da prole. Este fato não significa a não interferência da capacidade reprodutiva. Este pressuposto vem de encontro com os dados de Guerra<sup>13</sup>, que a capacidade reprodutiva de uma fêmea envolve aspectos variados da fisiologia reprodutiva, entre elas a capacidade de produção de gametas adequados, produção hormonal equilibrada, alterações morfológicas e bioquímicas de oviduto e útero compatíveis com os processos de transporte de espermatozoides, zigoto, fases precoces e tardias do desenvolvimento do conceito. Esta afirmação foi baseada no trabalho desenvolvido com ratas Wistar que receberam levonorgestrel do sétimo ao 13º dia de lactação, com o objetivo de avaliar o desenvolvimento físico dos filhotes lactantes. Os resultados mostraram que o levonorgestrel não altera o comportamento e toxicidade materna, porém houve retardo no desenvolvimento físico dos filhotes e atraso de um dia na puberdade dos filhotes machos<sup>14</sup>.

Com o mesmo intuito de verificar a capacidade reprodutiva de fêmeas F<sub>1</sub>, de mães tratadas com levonorgestrel, ratas Wistar foram tratadas com levonorgestrel do sétimo ao 13º dia após o nascimento, e nos 90 dias pós-natais foram acasaladas. O aleitamento de crias de ratas por mães tratadas com levonorgestrel não interferiu com a capacidade reprodutiva de fêmeas F<sub>1</sub><sup>13</sup>.

Estes estudos nos mostram que a toxicidade reprodutiva pode repercutir em alterações anatômicas, morfológicas ou bioquímicas, porém as repercussões funcionais no sistema reprodutivo podem ser mais sutis, não acompanhando alterações morfológicas grosseiras. Baseado nestes fatos, se faz necessário mais estudos com o antimoniato de meglumina no intuito de verificar sua possível transferência materno-fetal durante a lactação e conseqüências em proles adjacentes, afetando o comportamento sexual e reprodutivo da cria quando atingir a vida adulta. Neste trabalho, propõe-se investigar o efeito cumulativo do antimoniato de meglumina na geração F1 (prole de progenitores expostos ao composto), avaliando sua capacidade reprodutiva, e as conseqüências da intoxicação crônica em proles adjacentes.

## MÉTODOS

Para este estudo foram utilizados 59 camundongos fêmeas Swiss, pesando entre 25 e 35 gramas, oriundos do Laboratório de Experimentação Animal da URI – Campus de Erechim, mantidos em ambiente adequado, com temperatura controlada (22 ± 2°C), ciclo de 12 horas claro/escuro, com água e alimentação à vontade. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da URI – Campus de Erechim com registro nº 044/PPA/2006 e foram seguidos os princípios éticos de experimentação animal estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Em trabalho anteriormente realizado, foram utilizadas camundongos Swiss (geração F0) que foram acasalados com machos da mesma linhagem e, após a detecção do *plug* vaginal, foi considerado primeiro dia de gestação (1ºddg)<sup>15</sup>. Em seguida, os animais foram tratados com antimoniato de meglumina, (Glucantime®, Aventispharma, lote 206305, ampolas de 5 ml), adquirido comercialmente, contendo aproximadamente 85 mg Sb<sup>3+</sup>/ml, administrado via subcutânea, diariamente, do sétimo ao 12º dia de gestação

(organogênese), na dose equivalente a 100mgSb<sup>3+</sup>/kg peso/dia. Esta dose equivale à terapêutica (20mg/kg/dia) por 30 dias. O grupo controle recebeu apenas o veículo (água destilada). Após o nascimento da prole (geração F1), foi realizado teste de reflexos para avaliar o desenvolvimento físico e neuromotor.

As ninhadas nascidas de mães controles (F1c) e de mães tratadas (F1t), com aproximadamente 50 dias de idade, foram examinadas diariamente, no período da manhã, para determinação do ciclo estral. Para tanto, foi coletada a secreção vaginal com cotonete embebido em solução salina (NaCl 0,9%), introduzindo, não profundamente, a ponta dentro da vagina do camundongo fêmea para determinar o ciclo reprodutivo; realizou-se o esfregaço para posterior coloração com HE e análise microscópica da citologia da secreção<sup>16</sup>.

Quando determinado o ciclo estro, as fêmeas virgens foram acasaladas com machos da mesma linhagem e a presença do *plug* vaginal foi tomada como indicativo de prenhez e considerado primeiro dia de gestação (ddg).

No 18º ddg, os animais controles e experimentais foram eutanasiados por câmara de CO<sub>2</sub>, o abdômen incisado e o útero exposto e removido, quando se avaliou os sítios de desenvolvimento embrionário e fetal quanto ao número de reabsorções, fetos vivos e fetos mortos. A viabilidade fetal foi determinada pelo estímulo táctil. Com os parâmetros reprodutivos foram calculados os dados a seguir:

- Índice de perda pós-implantação:  

$$\frac{\text{nº de implantações} - \text{nº de fetos vivos} \times 100}{\text{nº de implantações}}$$
- Taxa de viabilidade fetal:  

$$\frac{\text{total de fetos vivos} \times 100}{\text{total de sítios}}$$

Realizou-se também o peso do feto e da placenta, a fim de verificar o índice placentário:

- Índice placentário:  $\frac{\text{peso placenta}}{\text{peso do feto}}$

Todos os fetos foram examinados quanto a anomalias externas grosseiras, e suas respectivas placentas foram processadas pela técnica rotineira em parafina.

Foi utilizado o teste T Student para a análise dos índices de perda pré-natal e taxa de viabilidade fetal; e o índice de fertilidade foi analisado pelo teste de Fisher. Foi considerada diferença estatisticamente significativa quando p < 0,05.

## RESULTADOS

Ao longo do período observado, não houve diferenças estatisticamente significativas entre o intervalo precoal dos animais controles e experimentais, uma vez que o período do ciclo reprodutivo foi semelhante em ambos os grupos.

O índice de fertilidade não apresentou diferença significativa entre o grupo controle e experimental (Tabela 1). Nota-se que 88,8% (n=24) das fêmeas do grupo experimental e 81,2% (n=26) do grupo controle foram copuladas, sendo que seis animais experimentais apresentaram infertilidade no decorrer do estudo, porém, isto não foi relevante quando comparado ao grupo controle.

**Tabela 1 - Efeito cumulativo do antimoniato de meglumina na performance reprodutiva de progênies F1**

Parâmetros	Grupo Controle	Grupo Experimental
Total de fêmeas	27	32
Total de fêmeas copuladas	24	26
Intervalo precoceital*	2,11 ± 1,69	2,44 ± 0,88
Índice de fertilidade (%) <sup>a</sup>	88,8	81,25

\* Valores expressos como média±erro (p<0,05)

<sup>a</sup> Índice de Fertilidade (%) = n° de fêmeas grávidas/n° de total de fêmeas

**Tabela 2 - Efeito do antimoniato de meglumina na transferência materno-fetal de camundongos da geração F1 e embriofetotoxicidade em progênies F2**

Parâmetros	Grupo Controle	Grupo Experimental
N° de fêmeas	09	11
N° de implantações	11,67 ± 3,94	11,00 ± 2,60
N° de reabsorções	1,44 ± 1,67	0,44 ± 0,53
N° de fetos vivos	10,11 ± 3,51	10,55 ± 2,65
N° de fetos mortos	0,11 ± 0,33	0,00 ± 0,00
Índice de perda pré-natal	11,60 ± 15,41	4,48 ± 5,63
Taxa de viabilidade fetal	86,18 ± 15,65	96,26 ± 5,45
Peso corporal do feto (g)	0,86 ± 0,20	0,82 ± 0,12
Peso da placenta (g)	0,12 ± 0,007	0,12 ± 0,0010
Índice placentário	0,14 ± 0,029	0,15 ± 0,02

Valores expressos como média±erro (p< 0,05)

Vinte fêmeas matrizes F1, controle e experimentais, completaram os 18 dias do período gestacional estabelecido, sendo as mesmas utilizadas para a análise da performance reprodutiva.

Os parâmetros reprodutivos das fêmeas F1 estão descritos na Tabela 2.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas no número de sítios de implantação, reabsorções e fetos vivos dos animais experimentais quando comparado ao grupo controle.

Observa-se que somente um feto morto foi encontrado no grupo controle, aumentando o índice de perda pré-natal no grupo descrito; no entanto considera-se essa diferença sem significância, uma vez que não alterou os parâmetros estatísticos.

A taxa de viabilidade fetal, o peso corporal do feto e o peso da placenta foram semelhantes no grupo experimental e controle.

Avaliando-se o índice placentário, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e experimental.

A análise histológica das placentas de progênies F2 não apresentou diferenças significativas quando comparadas com o grupo controle; e não foi relatada a ocorrência de malformação externa grosseira.

## DISCUSSÃO

A exposição materna a agentes químicos durante o período gestacional pode resultar em alterações no desenvolvimento do conceito, dependendo de fatores inerentes ao organismo materno, da

funcionabilidade placentária ou da ação direta no próprio organismo embriofetal. Essas alterações podem levar à morte embriofetal, malformações ou anomalias ao nascer ou ainda prejuízo no desenvolvimento físico e/ou comportamental do recém-nascido<sup>17</sup>.

O antimoniato de meglumina é um antimônio pentavalente (SbV) utilizado como primeira escolha no tratamento das leishmanioses, inclusive durante o período gestacional, mesmo apresentando características extremamente tóxicas e irritantes<sup>4</sup>.

Sabe-se que doses repetidas de antimoniato de meglumina durante a gestação leva ao acúmulo gradual em órgãos maternos,<sup>11</sup> levando-nos ao questionamento do período de duração desses efeitos no organismo materno, assim como a segurança da prole que será exposta indiretamente a esta droga, com eventual alteração no comportamento sexual e reprodutivo da cria quando atingir a vida adulta.

Estudo realizado com antimoniato de meglumina na dose de 100mgSb<sup>v</sup>/kg/dia, em camundongos, apresentou embriofetotoxicidade e morfologia placentária alterada quando administrado no período de organogênese e fetal; sugerindo-se ação do medicamento na desestruturação das camadas da placenta, podendo causar alterações de funcionabilidade e, por conseguinte, podendo agir no organismo embriofetal<sup>18</sup>.

A possível toxicidade do antimoniato de meglumina é resultante do acúmulo gradual de Sb<sup>v</sup> nos tecidos maternos e embrionários, devido a doses repetidas de antimoniato de meglumina<sup>11</sup>.

Em estudos realizados com ratas tratadas com 300mg Sb<sup>v</sup>/kg/dia durante todo período gestacional (20 dias), foram apresentadas malformações ósseas e também malformações viscerais. Essas alterações são consideradas indicativas de teratogenicidade. Porém, quando administrou-se três doses de 300mg Sb<sup>v</sup> /kg em um único dia, no 11<sup>o</sup>ddg, não observou-se efeitos embriofetotóxicos. Estudos de cinética com o antimoniato de meglumina apoiam essa hipótese, demonstrando que o mesmo apresenta três tempos farmacocinéticos, e a última fase de eliminação é bastante lenta, resultando no acúmulo de Sb<sup>v</sup>, quando administrado em doses repetida<sup>11</sup>.

Conforme foi observado em nossos resultados, o antimoniato de meglumina não apresentou efeito sobre a prole F2, uma vez que não foram observadas alterações nos parâmetros reprodutivos, podendo-se sugerir que o acúmulo gradual do antimoniato de meglumina ocorre com maior eficácia durante o período em que o mesmo está sendo administrado no organismo materno, com posterior eliminação lenta, porém completa, deste fármaco. Os resultados encontrados confirmam os dados de Krignill<sup>15</sup>, que observou que o antimoniato de meglumina não interferiu no desenvolvimento físico e neuromotor da prole. Porém, não significa que o mesmo não possa interferir com a capacidade reprodutiva, pois a capacidade reprodutiva de uma fêmea envolve aspectos variados da fisiologia reprodutiva: capacidade de produção de gametas adequados, produção hormonal equilibrada, alterações morfológicas e bioquímicas de oviduto e útero compatíveis com os processos de transporte de espermatozoides, zigoto, fases precoces e tardias do desenvolvimento do conceito<sup>13</sup>. Sob tal ponto de vista, as fêmeas F1 gestantes de nosso experimento, provenientes dos grupos controle e tratado, apresentaram intervalo precoceital e índice de fertilidade semelhantes,

portanto, a capacidade e eficiência reprodutiva pode ser considerada normal, indicando que o antimonio de meglumina não interferiu no comportamento sexual das crias.

O  $Sb^{V}$  apresenta peso molecular de 121,75 e conseqüentemente ultrapassa facilmente a barreira placentária de ratos e pode ser transferido pelo leite materno<sup>19</sup>. O fato de nossos experimentos não apresentarem alterações placentárias, não significa ausência de toxicidade, uma vez que agentes nocivos ao conceito nem sempre provocam alterações estruturais na placenta sendo que os dados analisados são insuficientes para inferir sobre a passagem placentária do fármaco.

## CONCLUSÃO

No modelo experimental usado, a exposição de camundongos ao antimonio de meglumina não afetou a capacidade reprodutiva de fêmeas F1, no entanto sugere-se que mais estudos sejam realizados a fim de analisar a transferência materno-fetal ou eliminação do fármaco, o que viria a confirmar seu efeito cumulativo.

**Conflito de interesse:** não há

## SUMMARY

### EVALUATE THE CUMULATIVE EFFECT OF MEGGLUMINE ANTIMONIATE ON THE PROGENY OF SWISS MICE: BIOLOGIC ASSAY

**OBJECTIVES.** Evaluate the effect of Meglumine Antimoniate on maternal-fetal transference in F1 generations (offspring of dams exposed to the drug), and embryotoxicity in F2 generations.

**METHODS.** Female Swiss mice were treated with daily s.c. injection of Meglumine Antimoniate (100mgSb<sup>V</sup>/kg bw/day) from day 7 until day 12 of pregnancy. The control group received only the vehicle (distilled water). After birth of offspring (F1 generation), 59 females were examined daily for determination of the estral cycle. When the cycle estrus was determined, males were mated with 18 females of the same lineage. On day 18 of pregnancy, females were euthanased in a chamber of CO<sub>2</sub> and after incision of the abdomen, the uterus was exposed. Then, resorptions as well as living and dead fetuses were evaluated, also the number of embryo/fetal implantation sites. Fetuses and their placenta were weighted to calculate the placental index. Three placentas of each litter were separated for microscopic analysis.

**RESULTS.** Administration of the Meglumine Antimoniate did not interfere in the estral cycle of the treated group, since it did not alter the pre-coital interval and fertility index. Placenta alterations were not observed in the F2 generations.

**CONCLUSION.** Meglumine Antimoniate did not interfere in the reproductive performance, after chronic exposition of dams. Data suggest that there is a gradual elimination of Meglumine Antimoniate by the maternal organism without damaging the future offspring. [Rev Assoc Med Bras 2008; 54(1): 13-6]

KEY WORDS: Meglumine. Mice. Teratogens. Contraception.

## REFERÊNCIAS

- Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Patologia estrutural e funcional. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1996. p.326-28.
- Who: World Health Organization. Leishmaniasis: background information: a brief history of the disease. [cited 2000 mar 26]. Available from: <http://www.who.int/leishmaniasis>.
- Marsden PD, Sampaio RN, Carvalho EM, Veiga JP, Costa JL, Llanos-Cuentas EA. High continuous antimony therapy in two patients with unresponsive mucosal leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 1985;34:710-3.
- Korolkovas A, Buckhalter JH. Química farmacêutica. Rio de Janeiro: Guanabara Dois; 1988. p.516-517, p.469-71.
- Berman JD. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin Infect Dis.* 1997;24:684-703.
- Felicetti SA, Thomas RG, McClellan RO. Metabolism of two valence states of inhaled antimony in hamsters. *Am Ind Hyg Assoc J.* 1974;35:292-300.
- Sampaio RN, Paula CD, Sampaio JH, Furtado RS, Leal PP, Rosa TT, et al. The evaluation of the tolerance and nephrotoxicity of pentavalent antimony administered in a dose of 40 mg Sb V/kg/day, 12/12 hr, for 30 days in the mucocutaneous form of leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1997;30:457-63.
- Dorea JG, Costa JM, Holzbecher J, Ryan DE, Marsden PD. Antimony accumulation in hair during treatment of leishmaniasis. *Clin Chem.* 1987;33:2081-2.
- Balana-Fouce R, Reguera RM, Cubria JC, Ordonez D. The pharmacology of leishmaniasis. *Gen Pharmacol.* 1998;30:435-43.
- Figueiro-Filho EA, Duarte G, El-Beitune P, Quintana SM, Maia TL. Visceral leishmaniasis (kala-azar) in pregnancy. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2004;12:31-40.
- Paumgarten FJ, Chahoud I. Embryotoxicity of meglumine antimoniate in the rat. *Reprod Toxicol.* 2001;15:327-31.
- Miranda ES, Miekeley N, De-Carvalho RR, Paumgarten FJ. Developmental toxicity of meglumine antimoniate and transplacental transfer of antimony in the rat. *Reprod Toxicol.* 2006;21:292-300.
- Guerra MO, Souza ER, Peters VM. Capacidade reprodutiva de ratas aleitadas por mães que receberam Levonorgestrel durante a lactação. *Rev Assoc Med Bras.* 2002;48:135-9.
- Souza ER, Oliveira LEG, Guerra MO, Peters VM. Administração de levonorgestrel a ratas lactando: desenvolvimento físico das crias. *Bol Centro Biol Reprod.* 2000;19:41-54.
- Krignill, CJ. Administração do antimonio de meglumina em camundongos durante a organogênese: desenvolvimento físico e neuromotor da prole [monografia]. Erechim: Curso de Farmácia, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões-URI; 2006.
- Marcondes FK., Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol.* 2002;62:609-14.
- Calliari MRT. Effects of prenatal exposure to restraint stress and monocrotophos on behavioral and physical development in the rat. *Genet Mol Biol.* 1998;21:171.
- Nava A, Roman SS. Efeito do antimonio de meglumina sobre a performance reprodutiva de camundongos prenhes. *Vivências.* 2006;1:201-12.
- Gerber GB, Maes J, Eykens B. Transfer of antimony and arsenic to the developing organism. *Arch Toxicol.* 1982;49:159-68.

Artigo recebido: 31/01/07

Aceito para publicação: 08/10/07