

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA  
SERGIO AROUCA  
ENSP

***“Desenvolvimento somático, neurocomportamental e fertilidade da prole de ratos exposta ao antimoniato de meglumina pela via transplacentária e leite materno”***

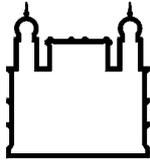
*por*

***Deise Riba Coelho***

*Dissertação apresentada com vistas à obtenção do título de Mestre em Ciências na área de Saúde Pública.*

*Orientador: Prof. Dr. Francisco José Roma Paumgarten*

*Rio de Janeiro, junho de 2010.*



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA  
SERGIO AROUCA  
ENSP

*Esta dissertação, intitulada*

***“Desenvolvimento somático, neurocomportamental e fertilidade da prole de ratos exposta ao antimoniato de meglumina pela via transplacentária e leite materno”***

*apresentada por*

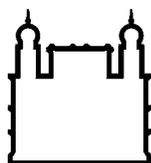
***Deise Riba Coelho***

*foi avaliada pela Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:*

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Isabella Fernandes Delgado

Prof. Dr. Sergio Noboru Kuriyama

Prof. Dr. Francisco José Roma Paumgartten – Orientador



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA  
SERGIO AROUCA  
ENSP

## A U T O R I Z A Ç Ã O

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores.

Rio de Janeiro, 07 de junho de 2010.

---

Deise Riba Coelho

CG/Fa

Serviço de Gestão Acadêmica - Rua Leopoldo Bulhões, 1.480, Térreo – Manguinhos-RJ – 21041-210  
Tel.: (0-XX-21) 2598-2730 ou 08000-230085

E-mail: [secasp@ensp.fiocruz.br](mailto:secasp@ensp.fiocruz.br) Homepage: <http://www.ensp.fiocruz.br>

Catálogo na fonte  
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica  
Biblioteca de Saúde Pública

C672 Coelho, Deise Riba  
Desenvolvimento somático, neurocomportamental e fertilidade da  
plote de ratos exposta ao antimoníato de meglumina pela via  
transplacentária e leite materno. / Deise Riba Coelho. Rio de Janeiro:  
s.n., 2010.

xi,72 f., tab., graf.

Orientador: Paumgarten, Francisco José Roma  
Dissertação (Mestrado) – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio  
Arouca, Rio de Janeiro, 2010

1. Leishmaniose-terapia. 2. Ratos. 3. Placenta-efeitos de drogas. 4.  
Reprodução-efeitos de drogas. 5. Antiprotozoários-toxicidade. 6.  
Meglumina-toxicidade. 7. Efeitos Tardios da Exposição Pré-Natal. I.  
Título.

CDD - 22.ed. – 616.9364

## AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e por em toda minha jornada ter-me concedido saúde, força e perseverança para avançar e concluir este trabalho.

Aos meus pais, que me ensinaram a viver com dignidade. Iluminaram-me os caminhos com afeto e dedicação, para que eu os trilhasse sem medo.

Ao meu namorado, que soube me compreender e me acalmar nos períodos mais difíceis e mais cansativos. Conseguindo, através de suas palavras e carinho, resgatar minha força, para que eu conseguisse dar um passo após o outro.

Ao meu irmão, tio, tia, demais familiares e amigos que sempre torcem por mim.

A Francisco Paumgarten, por sua orientação e pelas oportunidades a mim oferecidas ao longo da minha formação.

A Rosângela Ribeiro de Carvalho, a amiga Rose, que entrou de cabeça comigo neste trabalho, repartindo seus conhecimentos e experiências profissionais e de vida. Sem sua ajuda eu não teria conseguido realizar muitos dos experimentos que compõe esta dissertação.

A Andreia, Wagner, Leandro, Tamiris, e todas as pessoas que participaram da realização dos meus experimentos e me ajudaram imensamente, além de tornarem os dias e mais dias dentro daquele biotério um pouco menos pesados.

A Ana Cecília, Maria Regina, Sérgio Kuriyama, Hellen, Kátia, Andressa, Camile, Monique, Lívia, Esdras, Tiago, Karen, Marcia, Otávio, enfim, a todos do Laboratório de Toxicologia Ambiental pela convivência e pela ajuda e apoio oferecidos direta ou indiretamente.

Aos amigos que fiz ao longo do mestrado (principalmente, Daniele, Beatriz, Débora e Daniel) por tornarem cada dia de aula mais suave e alegre, pelas poucas, mas memoráveis “esticadinhas” após as aulas, fundamentais para liberar as tensões. E a todas as colegas de turma pela união e companheirismo, que foram fundamentais para a conclusão das disciplinas.

A FIOCRUZ, CAPES E FAPERJ, pelo auxílio financeiro.

## **RESUMO**

Embora os antimoniais pentavalentes (antimoniato de meglumina, AM, e estiboglucanato de sódio) tenham sido introduzidos no mercado em meados dos anos 1940, eles ainda são medicamentos de primeira linha no tratamento das leishmanioses. Sendo um fármaco antigo para uma das doenças mais negligenciadas, há importantes lacunas na base de dados não clínicos de segurança disponível para o AM (e.g. estudos de toxicidade reprodutiva). Neste estudo investigamos se o tratamento com AM durante a gestação e lactação prejudicaria o crescimento pós-natal, a maturação neurocomportamental e a fertilidade da prole na vida adulta. Ratos Wistar foram tratados com AM (0, 75, 150 and 300 mg Sb<sup>+5</sup>/kg peso corporal/dia, via sc) durante a gravidez (dia 1 de gravidez em diante), parto e lactação até o desmame (dia 21 pós-natal, 21PN). A prole das mães tratadas foi avaliada quanto ao crescimento pós-natal, maturação somática e neurocomportamental (dias nos quais marcos do desenvolvimento apareceram, e teste do campo aberto nos dias 25 e 60 PN). O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisas do Uso de Animais da FIOCRUZ (CEUA, L0016/08). As ratas tratadas com AM não exibiram deficits de ganho de peso ou outros sinais de toxicidade materna. A duração da gravidez, o tamanho da ninhada, e o peso dos filhotes ao nascimento não foram alterados pelo tratamento com AM. O peso da prole nos grupos tratados com as duas maiores doses foi reduzido nas dias 50 e 60 PN. Os marcos do desenvolvimento físico e reflexos, a maturação sexual e a fertilidade na vida adulta não foram afetados. A prole feminina das mães tratadas com as duas maiores doses apresentou uma exploração vertical (frequência de levantar) reduzida no teste do campo aberto realizado no dia 60 PN. O peso do fígado discretamente menor foi achado em machos e fêmeas mortos na idade adulta. Considerados em conjunto, os resultados desse estudo sugeriram que, exceto por alguns poucos efeitos de menor monta em relação ao peso corporal e desempenho no teste do campo aberto no dia 60 PN, notados apenas na prole feminina, o tratamento materno com AM, no intervalo de doses testado, durante toda a gestação e lactação, não afetou o desenvolvimento, maturação e fertilidade da prole exposta.

## **ABSTRACT**

Although having been introduced in the market in mid 1940s, pentavalent antimony drugs (meglumine antimoniate, MA, and sodium stibogluconate) are still first choice drugs for treatment of leishmaniasis. Being a rather old drug for one of the most neglected diseases, important gaps are found in the non-clinical safety data base available for MA (e.g., reproductive toxicity studies). In this study we investigated whether maternal treatment with MA during gestation and lactation impaired the postnatal growth, neurobehavioral maturation and fertility of the offspring in the adulthood. Wistar rats were treated with MA (0, 75, 150 and 300 mg Sb<sup>+5</sup>/kg body wt/day by sc route) during pregnancy (from gestation day 1 onwards), parturition and lactation until weaning (postnatal day 21, 21PN). The offspring of treated dams was evaluated regarding postnatal growth, somatic and neurobehavioral maturation (day on which developmental landmarks appeared and open field test on 25 and 60 PN). The study protocol was approved by the Ethical Committee on the Use of Animals of FIOCRUZ (CEUA, L0016/08). Dams treated with MA did not show body weight gain deficits or other signs of maternal toxicity. Duration of pregnancy, litter size and pup body weight at birth were not altered by maternal treatment with MA. Pup body weight in groups exposed to the two highest doses was reduced on 50 e 60PN. The milestones of physical and reflexes development, sexual maturation, and fertility in adulthood were not affected. Female offspring from mothers treated with the two highest doses showed a decreased vertical exploration (rearing up frequency) in the open field test on 60 PN. A slightly lower liver weight was found in males and females euthanized in adulthood. Taken together, results from this study suggested that, except for a few minor effects in female body weight and open field behavior on 60 PN, maternal treatment with MA, in the dose range tested, during the whole pregnancy and suckling periods, did not affect the development, maturation and fertility of the exposed offspring.

## SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO.....	1
1.1 – Leishmaniose.....	5
1.1.1 – Ciclo biológico.....	7
1.1.2 – Epidemiologia.....	8
1.2 – Tratamento da leishmaniose.....	12
1.2.1 – Antimoniais pentavalentes e antimoniato de meglumina.....	12
1.2.2 – Alternativas de tratamento.....	15
2 – JUSTIFICATIVA.....	17
3 – OBJETIVOS.....	18
3.1 – Objetivos gerais.....	18
3.2 – Objetivos específicos.....	18
4 – METODOLOGIA.....	19
4.1 – Animais.....	19
4.2 – Acasalamento.....	19
4.3 – Tratamento.....	19
4.4 – Acompanhamento das mães e dos filhotes.....	20
4.5 – Avaliação do desenvolvimento pós-natal dos filhotes.....	21
4.5.1 – Dia de aparecimento de marcos físicos do desenvolvimento....	21
4.5.2 – Avaliação do desenvolvimento de reflexos e comportamento exploratório dos filhotes.....	22
4.5.3 – Avaliação da fertilidade e desempenho reprodutivo dos animais expostos ao antimoniato de meglumina intra-útero e na lactação.....	25
4.5.3.1 – Acasalamento.....	25
4.5.3.2 – Cesárea e necropsia das fêmeas grávidas.....	25
4.5.3.3 – Avaliação dos órgãos reprodutivos masculinos.....	25
4.5.3.4 – Produção espermática diária dos testículos, contagem de espermatozóides do epidídimo e determinação do tempo de trânsito espermático.....	26
4.6 – Análise estatística.....	26
5 – RESULTADOS.....	28
5.1 – Efeitos do antimoniato de meglumina sobre o organismo materno e sobre mortalidade pré- e perinatal da prole exposta in útero.....	28

5.2 – Desenvolvimento pós-natal da prole de mães tratadas com antimoniato de meglumina durante a gravidez e lactação.....	36
5.3 – Desenvolvimento pós-desmame e fertilidade na vida adulta da prole de mães tratadas com antimoniato de meglumina durante a gravidez e lactação.....	44
6 – DISCUSSÃO.....	55
7 – CONCLUSÕES.....	61
8 – REFERÊNCIAS.....	62

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.1:</b> Incidência da leishmaniose visceral (LV) no Brasil (entre 1990 e 2007).....	<b>9</b>
<b>Tabela 1.2:</b> Incidência da leishmaniose tegumentar (LT) no Brasil (entre 1990 e 2007).....	<b>11</b>
<b>Tabela 5.1:</b> Efeito do tratamento com antimoniato de meglumina sobre o ganho de peso corporal ( $\Delta$ g) materno durante a gestação.....	<b>31</b>
<b>Tabela 5.2:</b> Peso corporal e dos órgãos das mães no dia da eutanásia, i.e., aproximadamente 10 dias após a última dose de antimoniato de meglumina. Os pesos (média $\pm$ DP) são expressos em gramas.....	<b>33</b>
<b>Tabela 5.3:</b> Efeitos do tratamento materno com antimoniato de meglumina sobre o tamanho da ninhada, mortalidade neonatal, razão sexual e número de implantações no útero materno.....	<b>35</b>
<b>Tabela 5.4:</b> Efeito do tratamento materno com antimoniato de meglumina durante a gravidez e lactação sobre o desenvolvimento pós-natal da prole: Dias de aparecimento (mediana e valores mínimo e máximo) de marcos do desenvolvimento físico no período pré-desmame.....	<b>39</b>
<b>Tabela 5.5:</b> Efeito do tratamento materno com antimoniato de meglumina durante a gravidez e lactação sobre o desenvolvimento pós-natal da prole: Dias de registro (mediana e valores mínimo e máximo) de reflexos no período pré-desmame.....	<b>40</b>
<b>Tabela 5.6:</b> Efeito do tratamento materno com antimoniato de meglumina durante a gravidez e lactação sobre o desenvolvimento neurocomportamental da prole masculina: Teste do campo aberto realizado no dia 25 de vida pós-natal (25 PN).....	<b>42</b>
<b>Tabela 5.7:</b> Efeito do tratamento materno com antimoniato de meglumina durante a gravidez e lactação sobre o desenvolvimento neurocomportamental da prole feminina: Teste do campo aberto realizado no dia 25 de vida pós-natal (25 PN).....	<b>43</b>

<b>Tabela 5.8:</b> Efeito do tratamento materno com antimoniato de meglumina durante a gravidez e lactação sobre os marcos do aparecimento da puberdade em fêmeas e machos. Dia (mediana, mínimo-máximo) em que o marco foi constatado e peso corporal (gramas, média $\pm$ DP) do filhote no dia do evento.....	<b>45</b>
<b>Tabela 5.9:</b> Efeito do tratamento materno com antimoniato de meglumina durante a gravidez e lactação sobre o desempenho da prole masculina no teste do campo aberto realizado na vida adulta (dia 60 de vida pós-natal, 60 PN).....	<b>47</b>
<b>Tabela 5.10:</b> Efeito do tratamento materno com antimoniato de meglumina durante a gravidez e lactação sobre o desempenho da prole feminina no teste do campo aberto realizado na vida adulta (dia 60 de vida pós-natal, 60 PN).....	<b>48</b>
<b>Tabela 5.11:</b> Desempenho reprodutivo da prole exposta intra-útero e ao longo da lactação ao antimoniato de meglumina. Ganho de peso gestacional de fêmeas que acasalaram com machos do mesmo grupo.....	<b>50</b>
<b>Tabela 5.12:</b> Desempenho reprodutivo da prole exposta intra-útero e ao longo da lactação ao antimoniato de meglumina. Dados obtidos por ocasião da cesariana de fêmeas que haviam engravidado de machos do mesmo grupo.....	<b>50</b>
<b>Tabela 5.13:</b> Desempenho reprodutivo da prole exposta intra-útero e ao longo da lactação ao antimoniato de meglumina. Peso corporal e peso do fígado e dos órgãos reprodutivos de machos (em gramas).....	<b>52</b>
<b>Tabela 5.14:</b> Fertilidade da prole masculina exposta intra-útero e ao longo da lactação ao antimoniato de meglumina. Contagem de espermátides e espermatozóides, produção espermática diária e tempo de trânsito espermático.....	<b>54</b>

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 5.1:** Alterações de peso corporal (em gramas) das mães tratadas com antimoniato de meglumina (0, 75, 150, 300 mg Sb<sup>+5</sup>/kg peso corporal /dia) durante gravidez, parto e lactação até o desmame da prole (dia 21 de vida pós-natal). Os dados são expressos como médias ± desvio padrão, e foram analisados a cada dia de tratamento pela ANOVA para amostras independentes complementada pelo teste de Dunnet. Diferenças foram consideradas significantes quando P<0,05. Com exceção do dia 22 de tratamento (época do parto espontâneo) não foram detectadas diferenças entre os grupos. As fêmeas foram pesadas diariamente durante todo o período de tratamento.....**29**

**Figura 5.2:** Evolução ponderal (gramas) da prole de mães tratadas com antimoniato de meglumina 0, 75, 150, 300 mg Sb<sup>+5</sup>/kg peso corporal /dia) durante gravidez, parto e lactação até o desmame da prole (dia 21 de vida pós-natal). Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão. Todos os dados foram analisados por ANOVA seguido do teste t de Dunnet. O Gráfico A corresponde às médias dos pesos unindo todos os filhotes de cada dose; o Gráfico B apresenta os pesos apenas dos machos e o Gráfico C os pesos apenas das fêmeas. Até o desmame os animais foram pesados de 5 em 5 dias, e pós-desmame a periodicidade foi de 10 em 10 dias. Para atingir a dose pretendida os volumes foram ajustados de acordo com o peso corporal materno a cada dia..... **37**

## **LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

ATP – adenosina trifosfato  
cm – centímetros  
DG – dia gestacional  
DP – desvio-padrão  
*et al* – *et alii* (e outros)  
g – grama  
GTP – guanosina trifosfato  
i.e – isto é  
im – intramuscular  
iv – intravenosa  
kg – quilograma  
LT – leishmaniose tegumentar  
LTA – leishmaniose tegumentar americana  
LV – leishmaniose visceral  
 $\mu$ l – microlitros  
mg – miligrama  
ml – mililitros  
mm – milímetro  
N – número ou tamanho da amostra  
NaCl – cloreto de sódio  
OECD – Organisation for Economic Co-operation and Development  
OMS – Organização Mundial de Saúde  
PN – dia pós-natal  
ppm – partes por milhão  
s – segundos  
Sb – antimônio  
sc – subcutânea  
SNC – sistema nervoso central

## 1 - INTRODUÇÃO

Os antimoniais pentavalentes (antimoniato de meglumina e estibogluconato de sódio) são amplamente empregados para tratar as diversas formas de leishmaniose. No Brasil, de acordo com o Ministério da Saúde<sup>1</sup>, o antimoniato de meglumina (Glucantime®) é ainda hoje o medicamento de primeira linha para tratamento dessas doenças.

Os antimoniais pentavalentes foram introduzidos no mercado em meados da década de 1940 como fármacos mais eficazes e menos tóxicos que os compostos orgânicos de antimônio trivalente (e.g., tártaro emético) até então usados no tratamento das leishmanioses. Naquela época os estudos realizados antes da comercialização de medicamentos novos eram muito limitados, quando comparados com a abrangente comprovação de eficácia e segurança, através de sofisticados estudos não clínicos e clínicos, que as agências regulatórias exigem hoje da indústria farmacêutica. Digno de nota é o fato dos antimoniais pentavalentes terem sido introduzidos no mercado 15 anos antes da tragédia da talidomida, no início dos anos 1960. Foi o impacto causado pela descoberta dos efeitos teratogênicos da talidomida que desencadeou uma série de exigências destinadas a tornar mais rigorosa a avaliação de segurança e eficácia pré-comercialização. O registro do antimoniato de meglumina (Glucantime®) no Brasil ocorreu em 1947 e antecedeu a lei básica de vigilância sanitária, a Lei 6360, sancionada em 23 de setembro de 1976, que ainda vigora e regula em linhas gerais o registro de medicamentos no nosso país. Segundo esta Lei (artigo 16, inciso III) para o registro de produto farmacêutico novo é necessário que “... sejam oferecidas amplas informações sobre a sua composição e o seu uso, para avaliação de sua natureza e determinação do grau de segurança e eficácia necessários”. Não surpreende, portanto que, a despeito de sua comprovada efetividade e das décadas de uso no tratamento das leishmanioses, ainda hoje existam importantes lacunas na base de dados toxicológicos disponível para a avaliação da segurança dos antimoniais pentavalentes.

Certamente contribuiu para a persistência dessas lacunas o fato das leishmanioses estarem incluídas entre as doenças mais negligenciadas do mundo, porque afligem principalmente populações pobres de países pouco desenvolvidos economicamente. Portanto, medicamentos para tratar as leishmanioses não são atraentes para iniciativa privada e as indústrias farmacêuticas não investem na pesquisa e desenvolvimento de remédios para essas doenças. Assim sendo, não se aprofunda o conhecimento sobre um medicamento utilizado há décadas, mas ainda fundamental no

arsenal terapêutico, e também não se investe na pesquisa de novos fármacos que sejam mais eficazes e seguros para tratar as leishmanioses<sup>2</sup>.

Embora sejam escassos, há na literatura alguns estudos toxicológicos sobre o antimoniato de meglumina, estudos estes que, em grande parte, são originários de instituições acadêmicas localizadas em países em desenvolvimento.

Alkhawajah *et al*<sup>3</sup> administraram dois antimoniais pentavalentes (estibogluconato de sódio e antimoniato de meglumina) por via intramuscular, a ratas Sprague Dawley do dia 6 ao dia 15 de gravidez. Os autores observaram, com os dois antimoniais pentavalentes, nas doses de 30, 100 e 300 mg Sb<sup>+5</sup>/kg de peso corporal/dia, um aumento dose-dependente da taxa de reabsorções (precoces). Foi constatada também uma redução do peso fetal e do tamanho da ninhada nos tratados em relação aos controles. Na dose de 900mg Sb<sup>+5</sup>/kg peso corporal / dia os antimoniais pentavalentes causaram a morte de todos os animais antes do final do experimento. Alkhawajah *et al*<sup>3</sup> também relataram a ocorrência de algumas anomalias em vísceras e esqueleto entre os expostos aos antimoniais pentavalentes *in útero*.

Paumgarten e Chahoud<sup>4</sup> trataram ratas Wistar com antimoniato de meglumina, administrado por via subcutânea, na dose de 300mg Sb<sup>+5</sup>/kg peso corporal /dia, entre os dia 6 e 15 de gestação. Os resultados deste estudo mostraram que o antimoniato de meglumina - na dose de 300mg Sb<sup>+5</sup>/kg peso corporal /dia - foi embriofetal e elevou a frequência de malformações ósseas nos fetos expostos. É importante destacar que esta dose embriofetal não foi tóxica para a mãe. Estes achados são motivo de preocupação, uma vez que o tratamento para a doença pode requerer mais de 30 dias de exposição ao medicamento e é doença grave cujo tratamento no caso da gravidez não pode ser postergado para depois do parto.

Miranda *et al*<sup>5</sup> estudaram a embriotoxicidade do antimoniato de meglumina (0; 75; 150 e 300mg Sb<sup>+5</sup>/kg de peso corporal /dia sc) em ratas Wistar, tratadas entre os dias 1 e 20 de gravidez, i.e., por 20 dias consecutivos. Os resultados deste estudo são consistentes com o trabalho anterior de Paumgarten e Chahoud<sup>4</sup> e indicaram que ocorreu embriofetalidade importante, na ausência de toxicidade materna explícita, no grupo de ratas tratadas com dose de 300mg Sb<sup>+5</sup>/ kg de peso corporal / dia. Os autores verificaram ainda um retardo no desenvolvimento pré-natal no grupo que recebeu a maior dose administrada, e uma diminuição dose-relacionada do peso corporal dos fetos, o que sugere que o antimoniato de meglumina foi embriofetal, embora não tenha sido teratogênico. Neste estudo os autores apresentaram dados demonstrando que parte significativa do antimônio presente no organismo das mães é transferida por via

transplacentária para os fetos. A determinação do antimônio no sangue das mães tratadas com 300mg Sb<sup>+5</sup>/kg de peso corporal/dia mostrou que –durante o tratamento- as mães acumularam progressivamente quantidades expressivas de antimônio no compartimento do qual ele é lentamente eliminado (i.e., compartimento para o qual a meia vida de eliminação é >>>> 24 horas).

Estudo realizado por Friedrich<sup>6</sup> envolveu o tratamento de ratas com antimoniato de meglumina (300mg Sb<sup>+5</sup>/kg de peso corporal/dia, sc) durante o período de lactação, i.e., por 15 dias consecutivos a partir do primeiro dia de vida pós-natal de seus filhotes. Após ordenhar as ratas, a autora encontrou antimônio no leite em níveis que correspondiam a 25% da concentração medida no sangue destas mães naquele dia. Friedrich também constatou que os filhotes absorveram este antimônio presente no leite, pois foram encontradas concentrações de antimônio no sangue destes filhotes que correspondiam a 77% dos níveis detectados no sangue materno. Como a concentração no leite era bem menor do que aquela encontrada no sangue dos filhotes esses resultados mostraram que o antimônio encontrado no leite é biodisponível por via oral como também que o antimônio absorvido por essa via acumula no organismo do filhote.

Além desses estudos experimentais em animais, existe também um reduzido número de investigações clínicas, i.e., relatos de casos de mulheres com leishmaniose que foram tratadas com antimoniais pentavalentes durante a gravidez e ou lactação.

Um desses casos, relatado por Berman *et al*<sup>7</sup>, diz respeito a uma mulher de 27 anos com leishmaniose cutânea que amamentava o seu filho, e merece atenção. A paciente em questão foi tratada com estibogluconato de sódio, por via intravenosa. No primeiro dia de tratamento ela recebeu uma dose de 1000mg de Sb<sup>+5</sup>, e nos 13 dias subseqüentes uma dose total de 1400mg Sb<sup>+5</sup> (que corresponde a aproximadamente 20mg Sb<sup>+5</sup>/kg de peso corporal/dia, iv). Berman *et al*<sup>7</sup> determinaram o nível de antimônio no soro e no leite materno e detectaram este metal em ambos. A coleta do sangue e do leite foi realizada em dois momentos: antes e depois da paciente receber o medicamento, e no sexto e no décimo-quarto dias de tratamento. Nas amostras coletadas antes da injeção, o leite apresentou concentrações de antimônio mais elevadas do que o soro. Entretanto, após o tratamento com o estibogluconato de sódio, os picos de antimônio no soro foram atingidos rapidamente e declinaram de forma mais rápida no soro do que no leite. Os dados sugerem que a razão sangue:leite materno difere nos componentes rápido e lento de eliminação do antimônio. Desta forma, e em associação com os resultados experimentais obtidos por Friedrich<sup>6</sup>, é possível concluir que o

antimônio, presente em medicamentos que contenham antimônio pentavalente, passa para o leite materno.

O tratamento com antimoniais pentavalentes durante a gravidez é defendido por Utili *et al*<sup>8</sup>. Esses autores relataram que uma mulher de 39 anos com leishmaniose visceral que estava no segundo trimestre de gravidez recebeu 850mg Sb<sup>+5</sup> por dia durante 20 dias. Ela deu a luz a uma menina saudável, em parto a termo. Esta menina foi monitorada durante 18 meses pós-parto e durante este período manteve boas condições de saúde. A partir desta observação isolada, o autor concluiu que a dose de antimônio pentavalente administrada foi efetiva e não tóxica para o feto mesmo quando utilizada no segundo trimestre da gravidez. Esta gestante de 39 anos, no momento da hospitalização, estava em mau estado de saúde e apresentava febre alta.

Silveira *et al*<sup>9</sup> reportou o caso de uma jovem de 19 anos grávida (na sua segunda gestação) que foi tratada quando estava aproximadamente na vigésima quarta semana (final do segundo trimestre) pós-concepção. A jovem grávida apresentava os sintomas de leishmaniose visceral há cerca de cinco meses e residia em área endêmica (interior da Bahia). Após a confirmação da infecção ela recebeu antimoniato de meglumina por via intravenosa, uma vez ao dia, na dose de 850 mg Sb<sup>+5</sup>/dia. Após o quinto dia de tratamento a paciente entrou em trabalho de parto nascendo uma criança do sexo feminino que faleceu no dia seguinte, devido à prematuridade e às complicações associadas a esta condição. Inferências sobre relações de causalidade são difíceis em relatos de casos. Neste caso, por exemplo, o parto prematuro pode ter sido precipitado por diversos fatores e não pelo tratamento em si. A jovem foi hospitalizada sem febre, mas relatava ter tido febre e anorexia ao longo dos meses anteriores, i.e., desde que começaram a aparecer os sintomas. Além disso, esta gestante de 19 anos informava ter precárias condições de vida e moradia.

O tratamento de mulheres grávidas com leishmaniose visceral é necessário, não só em virtude da gravidade da doença materna, com risco de vida para a gestante, mas também para evitar a transmissão vertical da doença para o filho. O risco de transmissão vertical na leishmaniose deve ser levado em consideração e esta forma de transmissão pode ser prevenida com a utilização do antimoniato de meglumina. Os relatos anteriormente citados, e a falta de mais estudos sobre a segurança do fármaco na gravidez e lactação ainda não permitem uma definição da melhor estratégia terapêutica nessas situações.

Outra justificativa apresentada para o tratamento durante a gravidez, mesmo no caso de leishmaniose cutânea, é a possibilidade das grávidas serem mais susceptíveis a

esta doença, como sustentado por Krishnan *et al*<sup>10</sup>. Esses autores verificam, em estudo experimental com camundongos, que a gravidez pode prejudicar a capacidade do sistema imune combater a infecção por protozoários do gênero *Leishmania*. Neste estudo as grávidas infectadas desenvolveram lesões maiores, a partir das quais foram coletados mais parasitas, do que nas lesões exibidas pelas fêmeas que não haviam engravidado.

A importância de investigar melhor a segurança dos antimoniais pentavalentes na gravidez é realçada pelo fato da leishmaniose ser doença em expansão no Brasil e no mundo. Tendo em vista essa expansão, pode-se prever que ocorrerá um aumento dos casos de mulheres grávidas e em fase de aleitamento infectadas com o parasita. Alguns pesquisadores têm alertado que a doença está se expandindo e tem invadido novas áreas peri-urbanas e urbanas em vários estados brasileiros. Esta expansão geográfica foi demonstrada, por exemplo, para leishmaniose visceral no estado de Pernambuco (no período de 1990 a 2001); no Maranhão (período de 1982 a 1996); em São Paulo (de 1999 a 2006); e em Mato Grosso (de 1998 a 2005)<sup>11, 12, 13, 14</sup>.

Em virtude de todos esses fatos, preencher as lacunas existentes na base de dados toxicológicos sobre a segurança dos antimoniais pentavalentes durante a gravidez e lactação é uma necessidade urgente em termos de saúde pública<sup>15</sup>. Este estudo pretende contribuir para melhorar a avaliação da segurança do uso do antimonio de meglumina em mulheres grávidas.

## **1.1 – Leishmaniose**

As leishmanioses são doenças parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitidas por mosquitos<sup>16</sup>. Os protozoários do Gênero *Leishmania*, pertencem ao ramo Protozoa, à classe Mastigophora, à família Tripanosomatidae.

A leishmaniose é doença de notificação compulsória no Brasil<sup>17</sup>. A Organização Mundial de Saúde (OMS) inclui a leishmaniose entre as doenças negligenciadas classificando-a na categoria 1, i.e., as principais e não controladas, das três categorias estabelecidas para essas doenças<sup>18</sup>.

A transmissão da leishmaniose ocorre através da picada de flebótomos, que são mosquitos dos gêneros *Phlebotomus* (Sul da Europa) e *Lutzomyia* (América). Diferentes espécies de flebótomos são responsáveis pela transmissão do protozoário. Aparentemente há uma afinidade entre a espécie do vetor e a espécie de leishmania. Normalmente, estes insetos são adaptados ao ambiente domiciliar e peri-domiciliar do

homem no meio rural e nas periferias da área urbana. A autonomia de vôo dos flebótomos é limitada e eles proliferam principalmente após período chuvoso. Apenas as fêmeas são hematófagas, e o repasto sanguíneo é necessário para que ocorra a maturação dos ovos. Os flebótomos picam o hospedeiro vertebrado geralmente entre o crepúsculo e 23 horas. Também podem ocorrer outras formas de transmissão da doença, porém são formas bem menos frequentes: pelo uso de seringas contaminadas, pela transfusão de hemoderivados (parenteral), por via transplacentária (congênita) e em acidentes no laboratório (ocupacional)<sup>19</sup>. Os hospedeiros vertebrados são o homem, o cão (principal reservatório), roedores silvestres, alguns marsupiais, primatas, raposas e preguiças<sup>20</sup>.

Os protozoários causadores da leishmaniose proliferam por reprodução assexuada (divisão binária), e ao longo do ciclo existem em duas formas:

- Forma amastigota (não apresenta flagelo), o estágio mais simples. As formas amastigotas estão presentes nos vertebrados, onde são encontradas no interior das células do sistema monocítico fagocitário, em cujo citoplasma elas se multiplicam. Estas formas podem dar origem a aglomerados que resultam de um grande número de divisões binárias.

- Forma promastigota (possui flagelo). Esta forma está presente nos hospedeiros invertebrados (vetores) onde são encontradas no interior do tubo digestivo.

Embora a leishmaniose se manifeste clinicamente de diferentes formas, os parasitas isolados de pacientes com as diversas formas clínicas da doença são morfolologicamente muito semelhantes. Dentro de cada subgênero podemos encontrar uma grande variedade de espécies causadoras da doença. As manifestações clínicas, o processo inflamatório desencadeado pelo parasita e a taxa de multiplicação deste dentro das células do sistema monocítico fagocitário dependem do agente etiológico (espécie de *Leishmania*) e também da resposta imunitária do hospedeiro vertebrado ao parasita<sup>16,21</sup>.

De acordo com as manifestações clínicas, a doença pode ser classificada em dois grandes grupos: a Leishmaniose Visceral (LV) ou Calazar, e a Leishmaniose Tegumentar (LT).

A LV é dividida em subtipos, que são caracterizados principalmente pela região do mundo onde ocorrem com mais frequência. Assim sendo, o Calazar neotropical é o tipo de LV que existe no Brasil e em países latino-americanos, atingindo adultos e crianças. O agente etiológico é a *Leishmania chagasi* e seu principal vetor é o flebótomo da espécie *Lutzomyia longipalpis*. Esta leishmania possui acentuado

viscerotropismo, instalando-se principalmente no baço, fígado, medula óssea, gânglios linfáticos, mucosa intestinal, e, em menor número, nos rins, supra-renais, pele e mucosas<sup>16</sup>. Este tipo de leishmaniose pode evoluir para o óbito se não for tratado<sup>22</sup>.

A leishmaniose tegumentar é causada por diferentes espécies do gênero *Leishmania* e pode se manifestar clinicamente de diversas formas. A maioria dos autores subdivide a LT em duas outras formas: a LT oriental e a LT americana (LTA). Esta última ocorre nos países latino-americanos. No Brasil, ela ocorre com diferentes prevalências em praticamente em todos os estados, mas principalmente na zona rural e em áreas florestais atingidas pelo desmatamento causado pelo homem<sup>16</sup>. Embora não seja letal, este tipo de leishmaniose também é motivo de preocupação, pois pode ter sério impacto psicossocial<sup>23</sup>. A LT precisa ser tratada, principalmente, nas seguintes situações: lesões persistentes, lesões localizadas próximo às juntas; lesões em número superior a 5; lesões iguais ou maiores que 5cm de diâmetro, e lesões que atingem as mucosas e podem causar deformidades no paciente<sup>24, 25, 26</sup>.

### **1.1.1 - Ciclo biológico**

Nos hospedeiros vertebrados o parasita se localiza no vacúolo digestivo dos histiócitos (ou macrófagos teciduais). Esses macrófagos fagocitam rapidamente o parasito que está no meio intersticial, mas não conseguem destruí-lo. A leishmania se multiplica no interior dos macrófagos, causando a destruição da célula hospedeira. A célula se rompe e as formas flageladas do protozoário (promastigotas) são liberadas no meio intercelular, sendo então fagocitadas por outros macrófagos o que estende a infecção dentro do organismo do hospedeiro<sup>27, 28</sup>.

O flebótomo - hospedeiro invertebrado – suga o sangue de um indivíduo ou um animal parasitado – e se infecta com as formas amastigotas das leishmanias presentes nas células do sangue ou da linfa intersticial do hospedeiro vertebrado. No interior do hospedeiro invertebrado o parasito evolui em seu tubo digestivo. As formas amastigotas tornam-se então alongadas e seus flagelos crescem, assumindo o protozoário a forma promastigota (por convenção o flagelo fica no pólo anterior da célula). Estes se multiplicam ativamente por divisão binária longitudinal, aumentando em número, e invadem porções anteriores do estômago e do proventrículo do inseto (que faz parte do intestino médio, precedendo imediatamente o estômago). A grande multiplicação parasitária pode vir a dificultar a ingestão de sangue pelo flebótomo, quando este tenta novamente se alimentar. O inseto faminto é assim levado a picar e a sugar repetidas vezes e, eventualmente, infectar muitas pessoas ou animais. Após cada esforço para

ingerir sangue, os músculos encarregados da sucção relaxam e causam a regurgitação do material aspirado. Desse modo o vetor inocula de forma eficiente as formas infectantes do parasita em novos hospedeiros vertebrados<sup>29, 21</sup>.

O ciclo da leishmania se completa quando, na pele do hospedeiro vertebrado, as formas promastigotas são fagocitadas pelos macrófagos, no interior dos quais se transformam em amastigotas. Desta forma ocorre a propagação da doença para novos indivíduos suscetíveis<sup>27</sup>.

### **1.1.2 – Epidemiologia**

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de contrair a leishmaniose, registrando-se aproximadamente dois milhões de novos casos das diferentes formas clínicas a cada ano<sup>30</sup>.

A LV tem ampla distribuição no mundo, ocorrendo na Ásia, na Europa, no Oriente Médio, na África e nas Américas. Esta doença já foi registrada em pelo menos 12 países da América Latina, onde 90% dos casos ocorrem no Brasil. A doença foi descrita em quase todas as Regiões do país. A leishmaniose tem apresentado mudanças importantes no padrão de transmissão, inicialmente predominava em ambientes rurais e periurbanos e, mais recentemente, vem ocorrendo em centros urbanos como Rio de Janeiro (RJ), Corumbá (MS), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Palmas (TO), Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS), entre outros<sup>31, 32</sup>.

Segundo o Ministério da Saúde<sup>31</sup>, em 19 anos de notificação (1984-2002), os casos de LV atingiram o total de 48.455, dos quais aproximadamente 66% ocorreram nos estados da Bahia, Ceará, Maranhão e Piauí. Com a expansão da doença para outras regiões esta situação vem se modificando. Este tipo de leishmaniose é mais freqüente em crianças menores de 10 anos (54,4%), sendo 41% dos casos registrados em crianças menores de 5 anos. O sexo masculino é proporcionalmente o mais afetado (60%). Tem sido visto que, nos últimos anos, a letalidade da LV vem aumentando gradativamente, passando de 3,6% no ano de 1994 para 6,7% em 2003, o que representa um incremento de 85%<sup>33</sup>.

Consultando a Tabela 1.1 é possível ter uma idéia da distribuição da leishmaniose visceral no Brasil no período de 1990 a 2007. Verifica-se que as taxas mais elevadas de incidência são as referentes às Regiões Norte e Nordeste. É evidente também a expansão do LV para as Regiões Centro-Oeste e Sudeste. É importante destacar que, no ano de 2007, a LV já foi detectada na Região Sul onde até então não havia sido registrada<sup>32</sup>.

**Tabela 1.1** – Taxa de incidência da leishmaniose visceral (LV) no Brasil (entre 1990 e 2007)

<b>Região</b>	<b>Ano</b>						
	<b>1990</b>	<b>1993</b>	<b>1996</b>	<b>1999</b>	<b>2002</b>	<b>2005</b>	<b>2007</b>
<b>Brasil</b>	1,3	1,7	2,1	2,2	1,4	1,9	1,69
<b>Norte</b>	0,4	0,8	1,2	3,1	2,4	4,2	4,84
<b>Nordeste</b>	4	5,5	6,5	6,4	2,9	3,8	2,94
<b>Sudeste</b>	0,4	0,1	0,2	0,3	0,6	0,8	0,78
<b>Sul</b>	-	-	-	-	-	-	0,01
<b>Centro-Oeste</b>	0,2	0,2	0,1	0,8	1,7	1,9	2,14

Fonte DATASUS, 2010. Número de casos por 100.000 habitantes

A LT constitui um problema de saúde pública em 88 países de quatro continentes (Américas, Europa, África e Ásia), com registro anual de 1 a 1,5 milhões de casos em todo o mundo. Esta doença é considerada pela OMS, como uma das seis mais importantes moléstias infecciosas, cuja morbidade preocupa principalmente pelo potencial de produzir deformidades se não for tratada. No Brasil, a LT apresenta ampla distribuição geográfica sendo registrada em todas as regiões do país<sup>32</sup>.

Até a década de 1950, a maior incidência de LTA era registrada nos estados de São Paulo, Paraná, Minas Gerais e Pernambuco. Na década de 1970, foram observados pequenos surtos em diversas localidades do Estado do Rio de Janeiro, particularmente na zona rural do Grande Rio e em Niterói. Nesta década mereceu destaque a epidemia de 1974 na baixada de Jacarepaguá<sup>34</sup>.

No Brasil, entre 1985 e 2005, registrou-se uma média anual de 28.568 casos autóctones de LTA. Na década de 1980, esta forma de leishmaniose foi assinalada em 19 unidades da Federação. Em 2003, entretanto, a LT foi registrada em todos os estados brasileiros. Esta doença ocorreu em indivíduos de ambos os sexos e em todas as faixas etárias, mas na média do país, a LT ocorreu predominantemente em pessoas maiores de 10 anos (90% dos casos) e no sexo masculino (74% dos casos)<sup>30</sup>.

Em 2004, a maior incidência de LT foi constatada nos estados do Acre, Pará, Tocantins, Maranhão, Rondônia, Amazonas e Mato Grosso<sup>30</sup>.

Na Tabela 1.2 é possível ter uma idéia da evolução da distribuição da leishmaniose tegumentar no Brasil no período de 1990 a 2007. Verifica-se que as incidências mais elevadas são as referentes à Região Norte, com taxas 4 a 6 vezes maiores do que a média nacional. Taxas elevadas também são registradas no Centro-Oeste e Nordeste.

Tabela 1.2 – Taxa de incidência da leishmaniose tegumentar (LT) no Brasil (entre 1990 e 2007)

Região	Ano						
	1990	1993	1996	1999	2002	2005	2007
<b>Brasil</b>	17,2	18,1	19,1	19,8	16,1	14,1	11,44
<b>Norte</b>	75,5	91,6	88,5	92,3	74	71,1	64,91
<b>Nordeste</b>	29,8	18,8	25,3	19,7	19,3	15,6	11,58
<b>Sudeste</b>	3,8	7,4	3,5	5,7	4	3,5	2,45
<b>Sul</b>	0,9	3,6	2,6	1,9	3,7	2	1,93
<b>Centro-Oeste</b>	26,9	39,6	45	56,9	39,9	33,3	23,28

Fonte DATASUS, 2010. Número de casos por 100.000 habitantes

## 1.2 - Tratamento da leishmaniose

### 1.2.1 – Antimoniais pentavalentes e antimoniato de meglumina

Gaspar Vianna foi o pioneiro na utilização de compostos orgânicos de antimônio para combater infecções causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. Em 1912 Vianna utilizou pela primeira vez o tártaro emético (que continha antimônio trivalente) para tratar a forma mucocutânea de leishmaniose americana. Em 1915, Cristina e Caronia, na Itália, assim como Rogers na Índia, confirmaram a efetividade do antimônio trivalente para tratar a leishmaniose e verificaram a sua eficácia terapêutica também no caso da forma visceral (calazar). Os efeitos adversos do tártaro emético, entretanto, impulsionaram a busca por alternativas de tratamento menos tóxicas. Nesse processo empírico de busca de novos agentes terapêuticos, foram testados na década de 1920 alguns antimoniais pentavalentes. Os antimoniais pentavalentes inicialmente testados foram a uréia estibamina, depois o estibosan e em seguida o neostibosan. Em 1936 surgiu o solustiban, que mostrou diversas vantagens sobre o antecessor neostibosan, entre as quais a maior estabilidade em meio aquoso e o fato de poder ser administrado pelas vias intramuscular, intravenosa e subcutânea, porque o solustiban não era tão irritante para os tecidos como o medicamento anterior. O antimoniato de meglumina (Glucantime<sup>®</sup>) foi desenvolvido no final da Segunda Guerra Mundial, na década de 1940<sup>28, 35, 36</sup>.

No Brasil, e em diversos outros países, os antimoniais pentavalentes ( $Sb^{+5}$ ) são considerados como medicamentos de primeira linha para o tratamento das leishmanioses. Existem no mercado duas formulações de  $Sb^{+5}$  complexados com carboidratos: o estibogluconato de sódio (mais utilizado em ex-colônias britânicas) e o antimoniato de meglumina. Aparentemente, não há diferenças quanto à eficácia e à toxicidade destes dois compostos orgânicos de antimônio pentavalente<sup>16,28</sup>.

O antimoniato de meglumina (Glucantime<sup>®</sup>) é o único antimonial pentavalente disponível no Brasil onde é adquirido e distribuído pelo Ministério da Saúde. O Glucantime<sup>®</sup> (antimoniato de meglumina) é disponível em ampolas de 5 ml, contendo 405 mg de  $Sb^{+5}$  (o equivalente a 81mg de  $Sb^{+5}$  por mililitro) ou 1,5g de antimoniato de meglumina. Este medicamento consta na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais<sup>37</sup> (Rename), cuja versão mais atualizada é a de 2009. A presença na Rename reflete a essencialidade deste fármaco, pois nela estão relacionados apenas os medicamentos considerados prioritários para a saúde da população brasileira. De acordo

com a Rename, o antimoniato de meglumina é remédio de uso hospitalar assim caracterizado: “*Uso hospitalar, compreendendo emprego de medicamentos em pacientes internados ou em pacientes ambulatoriais que necessitam de atendimento especializado ou ainda quando a administração implique risco à saúde*”<sup>37</sup>.

O mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes, incluindo o antimoniato de meglumina, ainda não foi totalmente elucidado, mas especula-se que o antimônio pentavalente ( $\text{Sb}^{+5}$ ) seja de fato uma pró-droga, sendo convertido a antimônio trivalente ( $\text{Sb}^{+3}$ ) que seria a espécie do metal com atividade leishmanicida. Essa redução do antimônio pentavalente a trivalente seria catalisada por grupos tióis presentes em moléculas de células do hospedeiro, e ou por tióis específicos do parasita<sup>36, 38, 39</sup>. Supõe-se que a redução do antimônio ocorreria principalmente no interior dos macrófagos, onde estão as formas amastigotas do parasita, pois o pH do meio e a concentração de tióis pode influenciar na redução do metal. É possível que exista mais de um mecanismo envolvido na ação leishmanicida do antimônio que parece interferir com a bioenergética das formas amastigotas de leishmania. Tanto a glicólise, quanto a oxidação dos ácidos graxos, que ocorrem em organelas específicas, são inibidos, sendo que esta inibição é acompanhada de diminuição da produção de ATP e GTP. Uma das evidências que apóia esta interpretação de que para exercer a ação leishmanicida é necessária a redução de  $\text{Sb}^{+5}$  para  $\text{Sb}^{+3}$  é o fato da forma trivalente ser mais eficaz contra as leishmanias<sup>40, 41, 42, 43</sup>. Evidências da conversão *in vivo* de  $\text{Sb}^{+5}$  em  $\text{Sb}^{+3}$  foram encontradas por Miekeley *et al*<sup>44</sup> em pacientes tratados por via intramuscular com antimoniato de meglumina. Os níveis mais significativos de  $\text{Sb}^{+3}$  foram detectados durante a fase lenta de eliminação, resultado que reforça a hipótese de que o  $\text{Sb}^{+3}$  seja a espécie responsável tanto pelos efeitos terapêuticos, quanto pelos efeitos adversos.

O  $\text{Sb}^{+5}$  aparentemente não se concentra no interior dos eritrócitos e atinge concentrações mais expressivas no plasma do que nas células sanguíneas enquanto o oposto parece ocorrer com a espécie trivalente no componente lento de eliminação<sup>45</sup>.

A eliminação do antimoniato de meglumina se ajusta ao previsto por modelos cinéticos com mais de um compartimento. Além de uma fase rápida com meia vida de minutos ou horas, há uma fase mais lenta, com a meia-vida de eliminação em torno de 24 a 72 horas; e uma fase lentíssima, com meia-vida de eliminação em torno de 50 dias<sup>44</sup>.

Como o antimoniato trivalente é espécie mais tóxica que o pentavalente, a toxicidade do antimoniato de meglumina pode estar relacionada com a biorredução e

com o acúmulo de  $Sb^{+3}$ . Este acúmulo, por sua vez, pode se dever à alta afinidade da espécie trivalente por macromoléculas de células sanguíneas e alguns tecidos<sup>46,47</sup>.

Nos últimos anos, doses progressivamente maiores dos antimoniais têm sido recomendadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pelo Centro de Controle de Doenças (CDC) dos Estados Unidos da América, devido ao aparecimento de resistência do parasita a esses medicamentos, principalmente em países como Sudão, Quênia e Índia<sup>31</sup>.

A maioria dos efeitos adversos relacionados ao tratamento com antimoniais pentavalentes aparece no final do tratamento, o que está de acordo com a hipótese de que a toxicidade deste medicamento se deve a acumulação do antimônio nos tecidos<sup>35</sup>.

O principal e mais freqüente efeito adverso do antimoniato de meglumina se deve à sua ação sobre o aparelho cardiovascular. De acordo com a severidade da cardiotoxicidade, que se manifesta como arritmias e pode levar à morte súbita, pode ser necessário reduzir ou suspender o tratamento, para que se possa evitar a morte do paciente<sup>48, 49, 50</sup>.

Além das alterações eletrocardiográficas como arritmias e/ou outras manifestações de cardiotoxicidade, tem sido relatados insuficiência renal aguda e/ou outras manifestações de nefrotoxicidade; icterícia e elevação dos níveis de transaminases e/ou outras manifestações de hepatotoxicidade; pancreatite aguda e/ou hiperamilasemia. Outros efeitos adversos freqüentes são artralgia, anorexia, dor no local da aplicação e aumento da diurese por perda transitória da capacidade de concentração urinária, náuseas, vômitos, fraqueza, cefaléia, tontura, palpitação, insônia, entre outros<sup>31, 51, 52, 53, 54</sup>.

O esquema terapêutico padrão (adultos) recomendado para a LV é 20mg de  $Sb^{+5}$  kg/dia, com aplicação intravenosa (iv) ou intramuscular (im), por no mínimo 20 e no máximo 40 dias consecutivos, sendo o limite máximo a injeção de 2 a 3 ampolas/dia. Este esquema tem tido bons índices de cura no Brasil. Sempre que existam condições de seguimento, o tratamento ambulatorial pode e deve ser realizado<sup>31</sup>.

O antimoniato de meglumina é indicado para o tratamento de todas as formas clínicas da LTA, embora as formas mucosas exijam maior cuidado, apresentando respostas mais lentas e maior freqüência de recidivas<sup>30</sup>. As formas cutâneas são usualmente tratadas com 10 a 20mg/ $Sb^{+5}$ /kg de peso corporal/dia, sendo recomendando 15mg/ $Sb^{+5}$ /kg de peso corporal/dia, iv lento ou im, por 20 dias consecutivos. Recomenda-se não ultrapassar 3 ampolas/dia. As formas mucosas são via de regra tratadas com 20mg/ $Sb^{+5}$ /kg de peso corporal/dia, por 30 dias consecutivos<sup>17</sup>.

Devido a sua toxicidade, o antimoniato de meglumina é contra-indicado para pacientes que possuem doença renal crônica, doença cardíaca, hepatopatia e hipersensibilidade aos seus compostos. Não é indicado o consumo concomitante de álcool, por aumentar o risco de hepatotoxicidade; bem como é recomendável evitar agentes que alterem o eletrocardiograma (antiarrítmicos e antidepressivos tricíclicos), pois podem dificultar a detecção do efeito tóxico do antimônio e ou aumentar o risco de arritmia<sup>1</sup>.

### **1.2.2 – Alternativas de tratamento**

Uma das alternativas aos antimoniais pentavalente é a anfotericina B. Este antibiótico tem sido utilizado como medicamento de segunda escolha para tratar leishmaniose desde a década de 1960<sup>55</sup>. A anfotericina B é o medicamento leishmanicida mais potente disponível comercialmente, atuando nas formas promastigotas e amastigotas do parasita, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Entretanto, os efeitos colaterais da anfotericina B são inúmeros e freqüentes. Esses efeitos adversos são dose-dependente, sendo a anfotericina B altamente tóxica para as células do endotélio vascular, e a flebite o efeito mais comum. Alterações pulmonares, como desconforto respiratório, dispnéia e cianose também são relatadas. As complicações renais com o uso da anfotericina B são as mais importantes, pois graus variados de comprometimento renal ocorrem em praticamente todos os pacientes ao longo do tratamento. Outros efeitos adversos podem também ser observados tais como febre, cefaléia, náuseas, vômitos, anorexia, tremores, calafrios, e distúrbios do comportamento. Recentemente, novas formulações da anfotericina B que atenuam consideravelmente os seus efeitos tóxicos tornaram-se disponíveis comercialmente. Essas formulações, entre as quais está a anfotericina B lipossomal, têm custo muito elevado e requerem cuidados especiais para transporte e conservação, praticamente impossibilitando o seu uso em larga escala na rotina dos serviços de saúde pública<sup>31,41,56</sup>.

Outro fármaco apontado, pelo Ministério da Saúde, como alternativa aos antimoniais no tratamento da leishmaniose é a pentamidina. Este fármaco é utilizado em casos de resistência ou intolerância em relação aos antimoniais<sup>31</sup>. A pentamidina tem elevada toxicidade e baixa eficácia, por isso é utilizada apenas quando os tratamentos citados anteriormente não apresentam resultados satisfatórios. Dentre seus efeitos adversos é possível citar a diabetes mellitus insulina dependente irreversível, e a

cardiotoxicidade que pode levar à morte. A pentamidina interfere com o metabolismo da glicose e pode levar a alterações glicêmicas nos dois sentidos, como a hipoglicemia seguida por hiperglicemia. O mecanismo que leva à ocorrência desta resposta bifásica ainda não foi esclarecido, podendo ocorrer citólise das células beta do pâncreas e, conseqüentemente, diabetes mellitus insulina dependente. O efeito diabetogênico parece ser cumulativo e dose dependente<sup>30,40,57</sup>.

## 2 – JUSTIFICATIVA

O estudo clínico da segurança de medicamentos durante a gravidez esbarra em impedimentos éticos quase intransponíveis, já que não se admite a realização de ensaios nesse período. O ensaio clínico em crianças também é questão éticamente delicada. Assim, a avaliação de segurança na gravidez e em crianças depende, pelo menos num primeiro momento, fundamentalmente de estudos não clínicos em animais.

Embora exista a possibilidade de diferenças inter-específicas, os dados obtidos em animais de laboratório são importantes indicadores dos efeitos que podem ser encontrados na espécie humana.

Sendo assim, este estudo junto com outros em andamento no nosso laboratório, contribuirá para a avaliação de segurança de antimoniais pentavalentes no tratamento da leishmaniose durante a gravidez e em crianças. Contribuindo para o preenchimento de lacunas existentes na base de dados toxicológicos deste medicamento, o que é uma necessidade urgente em termos de saúde pública.

O presente estudo, portanto, contribuirá para que os médicos possam decidir sobre o melhor esquema de tratamento, caso se depare com uma paciente grávida com leishmaniose, e também ter mais informações sobre os riscos da utilização deste medicamento em crianças.

É importante ressaltar que este trabalho se propõe a complementar estudos realizados anteriormente em nosso laboratório, que tiveram como foco a caracterização do potencial embriotóxico do antimoniato de meglumina em roedores. A investigação das possíveis consequências para a prole do tratamento materno durante esses períodos é necessária porque estudos anteriores em ratos indicaram que o antimônio no sangue da mãe é transferido, através da placenta e para o leite, e que o antimônio presente no leite é biodisponível por via oral.

### **3 – OBJETIVOS**

#### **3.1 – Objetivos gerais**

O trabalho aqui apresentado investiga eventuais efeitos adversos do tratamento materno com o antimonial pentavalente, ao longo de toda a gestação (exposição transplacentária) e período de amamentação (exposição via leite materno), sobre o desenvolvimento somático e neurocomportamental da prole exposta, assim como efeitos à longo prazo sobre a fertilidade e desempenho reprodutivo desta na vida adulta.

#### **3.2 – Objetivos específicos**

Verificar em ratos se o tratamento com antimoniato de meglumina durante toda a gravidez e lactação:

- causaria perdas gestacionais, alterando tamanho da ninhada, afetaria o crescimento pré-natal, alterando o peso ao nascimento, e ou influenciaria a mortalidade neonatal.

- afetaria a mortalidade, o ganho de peso, a maturação somática (marcos do desenvolvimento físico) e o desenvolvimento neurocomportamental (maturação de reflexos e comportamento exploratório no teste do campo aberto) da prole exposta.

- acarretaria alterações comportamentais (teste do campo aberto) á longo prazo detectáveis na vida adulta.

- afetaria a maturação sexual e a fertilidade e desempenho reprodutivo na vida adulta da prole exposta no período de desenvolvimento pré- e pós-natal.

## 4 - METODOLOGIA

### 4.1- Animais

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) fornecidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da FIOCRUZ. Os animais, com aproximadamente 95 dias de vida, foram mantidos em gaiolas, em condições padrão de temperatura ( $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), umidade (aproximadamente 70%) e ciclo claro/escuro de 12 horas. Os animais tiveram acesso *ad libitum* a água filtrada e ração (Nuvital®, Nuvilab, Curitiba, PR, Brasil).

### 4.2- Acasalamento

Após serem recebidos no laboratório seguiu-se um período de aclimação no biotério de experimentação de aproximadamente uma semana antes do acasalamento. O acasalamento ocorreu como descrito a seguir. Duas fêmeas nulíparas, escolhidas aleatoriamente, foram transferidas para a gaiola de um macho durante as duas últimas horas do período escuro do ciclo (i.e., de 6 às 8 horas da manhã). Transcorrido este período, as fêmeas foram retiradas e examinadas para a verificação da ocorrência da cópula. O cruzamento foi confirmado pela presença do “plug” (massa esbranquiçada de espermatozoides) no canal vaginal, ou pela visualização de espermatozoides no lavado vaginal (realizado com água destilada) examinado em lâmina a fresco. Após a confirmação do acasalamento as fêmeas foram pesadas e alojadas em gaiolas individuais sendo destinadas aleatoriamente aos diferentes grupos experimentais. As primeiras 24 horas após a constatação do acasalamento foram consideradas como dia zero de gravidez (DG 0).

### 4.3- Tratamento

O antimoniato de meglumina (Glucantime®, Sanofi-Aventis) foi administrado por via subcutânea, na região dorsal da rata durante toda gravidez, parto espontâneo e lactação, até o desmame da prole, i.e., por 42 dias consecutivos.

O grupo controle recebeu apenas o veículo (solução aquosa de metabissulfito de potássio e sulfito de sódio, com pH 7,0). Três grupos foram tratados com antimoniato de meglumina nas doses de  $75\text{mg Sb}^{+5}/\text{kg}$  de peso corporal/dia;  $150\text{mg Sb}^{+5}/\text{kg}$  de peso

corporal/dia; 300mg Sb<sup>+5</sup>/kg de peso corporal/dia. Todos os grupos foram tratados na mesma época.

O número de ratas grávidas destinadas aos grupos controle, menor dose, dose intermediária e maior dose foram nove, doze, dez e nove ratas, respectivamente. Essas ratas grávidas geraram as ninhadas avaliadas nesse estudo.

O peso das ratas grávidas foi registrado diariamente durante todo o tratamento, antes da injeção subcutânea (sc), permitindo assim ajustar o volume do fármaco a ser administrado. O volume de veículo administrado nas ratas do grupo controle correspondeu ao volume do medicamento injetado no grupo tratado com a dose intermediária.

#### **4.4 - Acompanhamento das mães e dos filhotes**

As fêmeas grávidas foram observadas quanto ao ganho de peso e aparecimento de sinais clínicos de toxicidade. Essas gestações evoluíram para o parto espontâneo que ocorreu a partir do 20º dia de gestação (DG 20). A partir do DG 20 as gaiolas passaram a ser inspecionadas para verificação do nascimento das ninhadas (os partos ocorreram principalmente entre no dia 22). O dia do nascimento foi designado como dia 1 pós-natal (1 PN) sempre que o trabalho de parto tenha sido concluído antes das 13 horas. Quando a finalização do trabalho de parto ocorreu após as 13 horas, o dia subsequente foi considerado dia 1 PN. No dia 1 PN registrou-se o número de filhotes nascidos, número de machos e fêmeas em cada ninhada, e o peso dos filhotes. A partir desta data, os filhotes foram pesados de 5 em 5 dias até o dia 20 PN (que corresponde ao dia anterior ao desmame). Após o desmame, a pesagem dos filhotes passou a ser realizada de 10 em 10 dias (até o dia 60 PN). Estes intervalos entre as pesagens para acompanhamento do desenvolvimento pós-natal dos filhotes está de acordo com o recomendado pela Diretriz (“*Guideline*”) No. 426 da OECD<sup>58</sup>.

Após serem pesados no dia 1 de vida pós-natal, os filhotes foram marcados com injeção intradérmica de nanquim nas patas. O local da marcação foi determinado segundo código que permitia identificar individualmente cada filhote macho e fêmea da ninhada. Não foi realizada a padronização do tamanho da ninhada, i.e., as ninhadas permaneceram com o número original de filhotes.

Após o desmame, os filhotes foram alojados em gaiolas com 4 ou 5 animais do mesmo sexo e da mesma dose. Em torno do dia 30 PN as mães foram mortas por decapitação e necropsiadas sendo retirados o fígado, baço, rins, coração e útero. Os

órgãos foram pesados. O número de sítios de implantações no útero foi determinado pelo método descrito por Salewski<sup>59</sup>. Resumidamente, o útero foi aberto por incisão longitudinal e imerso em solução de sulfeto de amônio a 10% (Merck®), por 10 minutos e, em seguida, foi lavado em água corrente e mergulhado por mais 10 minutos em uma solução formada por partes iguais de ferrocianeto de potássio a 20% e ácido clorídrico a 1% (Merck®). Os sítios de implantação, que surgem como pontos escuros na parede uterina, são localizados e contados.

#### **4.5 - Avaliação do desenvolvimento pós-natal dos filhotes**

##### **4.5.1- Dia de aparecimento de marcos físicos do desenvolvimento**

Cada filhote foi examinado quanto ao aparecimento dos marcos do desenvolvimento somático. Foi registrado o dia em que o marco foi constatado. Os marcos físicos observados foram:

a - Descolamento das orelhas: os filhotes foram observados imediatamente após o nascimento (a partir do dia 1 PN) quanto ao descolamento bilateral e completo das orelhas. As observações foram realizadas diariamente até a detecção do evento<sup>60</sup>;

b - Surgimento de pêlos: os filhotes foram examinados a partir do dia 1 PN. Foi registrado o dia de surgimento da primeira penugem. As observações foram realizadas diariamente até a detecção da primeira penugem no dorso dos animais<sup>61</sup>;

c- Erupção dos incisivos: os filhotes foram examinados a partir do dia 6 PN. O exame procurou evidenciar o primeiro sinal de erupção dos incisivos através da gengiva. O resultado foi registrado como positivo após total rompimento tanto dos incisivos superiores, quanto dos inferiores<sup>62</sup>;

d- Abertura de olhos: os filhotes foram examinados diariamente partir do dia 12 PN até o registro do evento. Os olhos foram considerados abertos quando evidenciou-se a abertura bilateral e completa das pálpebras<sup>60</sup>;

e- Descida dos testículos: filhotes do sexo masculino foram avaliados quanto a descida bilateral dos testículos para o saco escrotal a partir do dia 14 PN. A palpação do escroto foi feita diariamente em todos os machos da ninhada até serem detectados os dois testículos<sup>63</sup>.

Os exames relacionados a seguir foram realizados após o desmame e marcam o início da puberdade dos animais. Foi registrado o dia em que o evento ocorreu.

f- Separação prepucial: filhotes do sexo masculino foram observados quanto à separação prepucial a partir do dia 30 PN. O prepúcio foi retraído (manualmente com leve pressão) para que fosse possível observar se o pênis já encontrava-se exposto. O exame foi realizado diariamente até que todos os machos da ninhada apresentassem a separação prepucial<sup>64</sup>;

g- Abertura do canal vaginal: as fêmeas foram examinadas quanto à abertura do canal vaginal a partir do dia 30 PN. A observação foi realizada diariamente até que cada fêmea da ninhada apresentasse o canal vaginal completamente aberto<sup>61</sup>;

h- Ciclo estral – primeiro estro: para determinar o dia em que as fêmeas apresentaram o primeiro estro, foram realizados lavados vaginais diários a partir do dia em que foi constatada a abertura vaginal completa. É importante ressaltar que os lavados foram realizados aproximadamente no mesmo horário, em todos os dias, para reduzir variabilidade e melhorar a identificação dos padrões do ciclo estral. A coleta de células ocorreu utilizando-se uma micropipeta, com 50 µl de água destilada (houve inserção apenas da extremidade da ponteira para evitar tanto quanto possível o desconforto dos animais). Logo em seguida foi realizada a avaliação, a fresco, dos tipos celulares do epitélio vaginal em lâmina examinada por microscopia óptica (Zeiss SV11, Alemanha - aumento de 200x). A avaliação foi feita com base nos seguintes critérios citológicos que caracterizam o estágio do ciclo estral: predominância de células epiteliais nucleadas (proestro); predominância de células epiteliais cornificadas (estro); presença de células epiteliais cornificadas e/ou leucócitos, e muco (metaestro); presença abundante de leucócitos (diestro)<sup>65,66</sup>.

Entre as avaliações anteriormente citadas, encontram-se aquelas que são preconizados pela OECD (*“Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment”*<sup>67</sup>) para acompanhamento do desenvolvimento físico da prole.

#### **4.5.2- Avaliação do desenvolvimento de reflexos e comportamento exploratório dos filhotes**

Os reflexos descritos a seguir foram examinados sendo registrados os dias em que surgiram de forma completa. Os testes realizados foram os seguintes:

a- Endireitamento postural: iniciou-se a pesquisa deste reflexo no dia 1 PN. Os filhotes foram cuidadosamente deitados em decúbito dorsal em uma superfície plana e observados. O reflexo foi considerado como totalmente formado se o filhote virasse para posição ventral e ficasse com todas as patas apoiadas sobre a superfície, em

posição que o permitia andar, dentro de no máximo 30 segundos (s). Foi registrado o dia em que este critério foi alcançado. A pesquisa, porém, continuou até que o filhote apresentasse resultados positivos por três dias consecutivos (para confirmação). Quando tal fato ocorria, o primeiro dia (desta sequência de três) em que o filhote apresentou a resposta positiva foi registrado como o dia em que o reflexo apareceu<sup>68,69</sup>;

b- Reflexo de prensão: iniciou-se a observação no dia 1 PN. Para pesquisar este reflexo usamos um bastão bem fino (1mm de diâmetro - ou “clip” de papel) para tocar a superfície palmar das patas dianteiras do filhote. Em resposta os dedos se dobras para segurar o bastão. Neste caso, registrou-se o dia do desaparecimento do reflexo, que deixa de se manifestar com a maturação do sistema nervoso central (SNC). O resultado foi considerado positivo quando ambas as patas dianteiras deixaram de apresentar o reflexo. Este teste foi realizado até apresentar resultados positivos por três dias consecutivos (para confirmação), mas foi registrado como dia de desaparecimento o primeiro dia (dos três) em que a resposta de prensão deixou de ocorrer<sup>70,71</sup>;

c- Esquiva ao abismo: Este teste avalia o ato de “fugir” da extremidade em que há abrupta descontinuidade da superfície plana (beira do abismo) que depende da percepção tátil. Inicia-se a pesquisa no dia 2 PN. Os filhotes foram gentilmente colocados em uma plataforma, com as pontas dos dedos das patas dianteiras e com a porção inicial do focinho na borda desta superfície. Considerou-se o reflexo positivo se o animal esquivou-se da borda em no máximo 10s. Cada filhote foi testado até apresentar consistentemente o reflexo. Esta pesquisa é realizada até o filhote apresentar resultados positivos por três dias consecutivos (para confirmação), mas o dia de aparecimento do reflexo foi registrado como sendo o primeiro dia (dos três) em que a resposta foi positiva<sup>68</sup>;

d- Geotaxia negativa: Iniciou-se no dia 1 PN. Para pesquisar esta resposta o filhote foi colocado com o focinho (cabeça) voltado na direção da base de um plano inclinado – em uma espécie de uma rampa - (i.e. altura da cabeça inferior a da cauda) e observado por no máximo um minuto. O resultado foi considerado positivo quando o filhote foi capaz de, neste intervalo de tempo, virar o corpo 180° passando a orientar a cabeça e o focinho em direção oposta à da base do plano e se deslocar para cima (subindo a rampa). Foi feita apenas uma tentativa por dia com cada animal, até a resposta positiva aparecer. Esta pesquisa de reflexo foi realizada até o filhote apresentar resultados positivos por três dias seguidos (para confirmação), mas o dia de aparecimento do reflexo foi registrado como sendo o primeiro dia (dos três) em que a resposta foi positiva<sup>68,69</sup>;

e- Postural em queda livre: pesquisado a partir do dia 12 PN consistiu em verificar a habilidade do animal de virar no ar durante queda livre em direção ao chão, após ter sido solto de costas a partir de uma altura de 35cm. O animal em queda foi amparado por uma superfície macia (espuma). Foi registrado visualmente se o filhote virou no ar para posição ventral e alcançou a superfície com as 4 patas. O reflexo foi pesquisado duas vezes por dia com cada animal e repetido até apresentar resultados positivos por três dias consecutivos (para confirmação). Porém, o dia de aparecimento do reflexo foi considerado como sendo o primeiro dia (dos três) em que a resposta foi positiva<sup>68,72</sup>;

f- Reação de sobressalto acústico (abertura do canal auditivo): este reflexo consiste em uma rápida extensão e posterior flexão de uma série de músculos que segue um estímulo auditivo repentino. Iniciou-se a pesquisa deste reflexo no dia 12 PN. O estímulo sonoro foi o estalo de uma ratoeira fechando. A resposta de sobressalto é uma repentina e breve extensão dos membros posteriores. A pesquisa deste reflexo foi realizada uma vez por dia até o aparecimento da resposta de sobressalto<sup>73,70</sup>;

g- Teste do campo aberto (“open field”): avalia o comportamento exploratório desencadeado por um ambiente novo e também a atividade locomotora. O teste foi realizado logo após o desmame (aproximadamente no dia 25 PN) e na vida adulta, i.e. por volta do dia 60 PN. Este teste utilizou uma arena circular, com seu solo dividido em 19 quadrantes. O animal foi colocado no centro da arena e o comportamento registrado por 6 minutos. Após cada teste e antes de ser colocado o animal seguinte, a arena foi limpa com etanol 20%, para prevenir a interferência do odor deixado pelo filhote anterior. Contadores manuais e cronômetros foram utilizados para registrar a frequência de locomoção (número de quadrantes atravessados); a frequência de “levantar” (“rearing up”), i.e., número de vezes em que o animal retira, simultaneamente, as duas patas dianteiras do chão; o tempo de permanência no quadrante central da arena e o número de episódios de “limpeza” (“grooming”; ou movimentos repetidos com as patas dianteiras, esfregando rosto e corpo). O número de bolos fecais deixados na arena foi registrado ao final do teste<sup>69,72</sup>.

### **4.5.3- Avaliação da fertilidade e desempenho reprodutivo dos animais expostos ao antimoniato de meglumina intra-útero e na lactação**

#### **4.5.3.1- Acasalamento**

Fêmeas e machos da prole de mães tratadas foram acasalados, respeitando-se o grupo de tratamento a que cada animal pertencia, mas evitando-se o cruzamento intraninhada. A fêmea foi transferida para a gaiola do macho (que estava alojado individualmente na gaiola) e repetido o procedimento conjunto até que se confirmasse a ocorrência do cruzamento (foram realizadas um máximo de 10 sessões). O período de alojamento conjunto ocorreu sempre durante as duas últimas horas do ciclo escuro (das 6 às 8 horas da manhã). Tal como anteriormente descrito, após cada sessão de acasalamento foi investigada a presença de plug no canal vaginal. Caso não tenha sido visualizado o plug, procedeu-se ao lavado vaginal (com água destilada) para pesquisar a presença de espermatozóides em lâmina a fresco. O dia em que o cruzamento foi confirmado foi considerado o dia zero de gravidez (DG 0).

#### **4.5.3.2- Cesárea e necropsia das fêmeas grávidas**

As fêmeas grávidas foram pesadas nos dias zero e vinte e um de gestação, quando foi realizada a cesariana. Os fetos foram removidos e examinados quanto ao estado geral e presença de anomalias, foi registrado o número de fetos mortos, o número de fetos viáveis, o número de reabsorções, o peso individual e o sexo dos fetos (para posterior análise da razão sexual – machos/fêmeas). O número de sítios de implantação no útero foi determinado pelo método de Salewski (já citado anteriormente). O fígado destas fêmeas também foi retirado e pesado.

#### **4.5.3.3- Avaliação dos órgãos reprodutivos masculinos**

Os machos foram eutanasiados e os órgãos reprodutivos foram removidos, e pesados. Os órgãos coletados e pesados foram: a vesícula seminal (pesagem com líquido seminal e sem o mesmo), a próstata, o testículo direito, o testículo esquerdo, o epidídimo direito e epidídimo esquerdo. O fígado também foi retirado e pesado.

#### **4.5.3.4- Produção espermática diária dos testículos, contagem de espermatozóides do epidídimo e determinação do tempo de trânsito espermático**

Foi determinado o número de espermátides por testículo; o número de espermátides por grama de testículo; a produção espermática; o número de espermatozóides por cauda de epidídimo e o tempo de trânsito espermático. Os tecidos foram homogeneizados como descrito a seguir: o testículo direito foi pesado e desencapsulado logo após a coleta sendo em seguida colocado em frasco com 10ml de solução de NaCl 0,9% contendo Triton X 100 0,5%. Em seguida o tecido foi homogeneizado em homogeneizador manual (Marca: Nova Técnica) tendo sido realizadas 15 homogeneizações por órgão na velocidade 4 do equipamento. A “solução” obtida foi então diluída 1:10 (retira-se 100 µl do homogenato e acrescenta-se 900µl da mesma solução salina com Triton X 100 0,5%). Deste homogenato diluído retirou-se 10µl para preencher a câmara de Neubauer (lê-se 4 campos por animal, os quadrantes externos com 16 quadrados) em que foram contadas as espermátides. Considerando que cada campo desta câmara corresponde a um volume de 0,1mm<sup>3</sup>, estimamos a quantidade de espermátides presentes em cada testículo direito.

Após a pesagem do epidídimo direito, a cauda deste foi separada e cortada em pequenos fragmentos. A homogeneização foi realizada da mesma forma que aquela descrita para os testículos sendo neste caso contados os espermatozóides.

A produção espermática diária foi obtida dividindo o número total de espermátides encontradas em cada testículo por 6,1 dias (o número de dias do ciclo seminífero em que estão presentes as espermátides resistentes à homogeneização, em ratos).

O tempo de trânsito espermático, em dias, foi calculado dividindo-se o número de espermátides de cada epidídimo pela produção espermática diária de cada animal.

#### **4.6 - Análise estatística**

As variáveis que apresentam distribuição normal (como os pesos, por exemplo) tiveram seus resultados comparados empregando-se a análise de variância de uma via (ANOVA). As diferenças entre os grupos tratados com antimoniato de meglumina e o grupo controle foram determinadas pelo teste *t* de Dunnet. Para as variáveis em que não foi possível assegurar que seguem uma distribuição normal, os resultados foram

comparados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste U de Mann-Whitney para determinar as diferenças entre dois grupos.

Em todos os casos, o nível de significância estatística considerado para rejeitar a hipótese de nulidade foi de  $\alpha = 5\%$  ( $p < 0,05$ ). Os cálculos estatísticos foram realizados por meio do programa SPSS® 13.0. Em todas as análises, a ninhada, e não o filhote individualmente, foi a unidade estatística empregada.

## 5 - RESULTADOS

### 5.1 - Efeitos do antimoniato de meglumina sobre o organismo materno e sobre mortalidade pré- e perinatal da prole exposta in útero.

O efeito do antimoniato de meglumina (0, 75, 150 e 300 mg Sb<sup>+5</sup>/kg de peso corporal / dia sc), administrado a partir do dia 1 de gravidez até o desmame da prole (dia 21 de vida pós-natal), sobre o ganho de peso materno é apresentado na Figura 5.1.

Como pode ser visto na Figura 5.1, com exceção do menor peso das mães tratadas com a dose intermediária (150 mg Sb<sup>+5</sup> /kg de peso corporal/dia) no 22º dia de tratamento (moda do dia de parto espontâneo na nossa colônia de ratos Wistar), a análise estatística não detectou diferenças entre os grupos. Este menor peso materno médio no dia em que o parto espontâneo ocorreu com maior frequência parece traduzir o fato de, neste grupo, no momento da pesagem, um número proporcionalmente maior de mães já terem parido as suas ninhadas. Nos dias de parto (dias 20-22 de gravidez) algumas mães foram pesadas ainda grávidas e outras após o nascimento dos filhotes o que resultou, como indicado na Figura 5.1, em ampla dispersão dos valores individuais de peso corporal em torno da média do grupo.

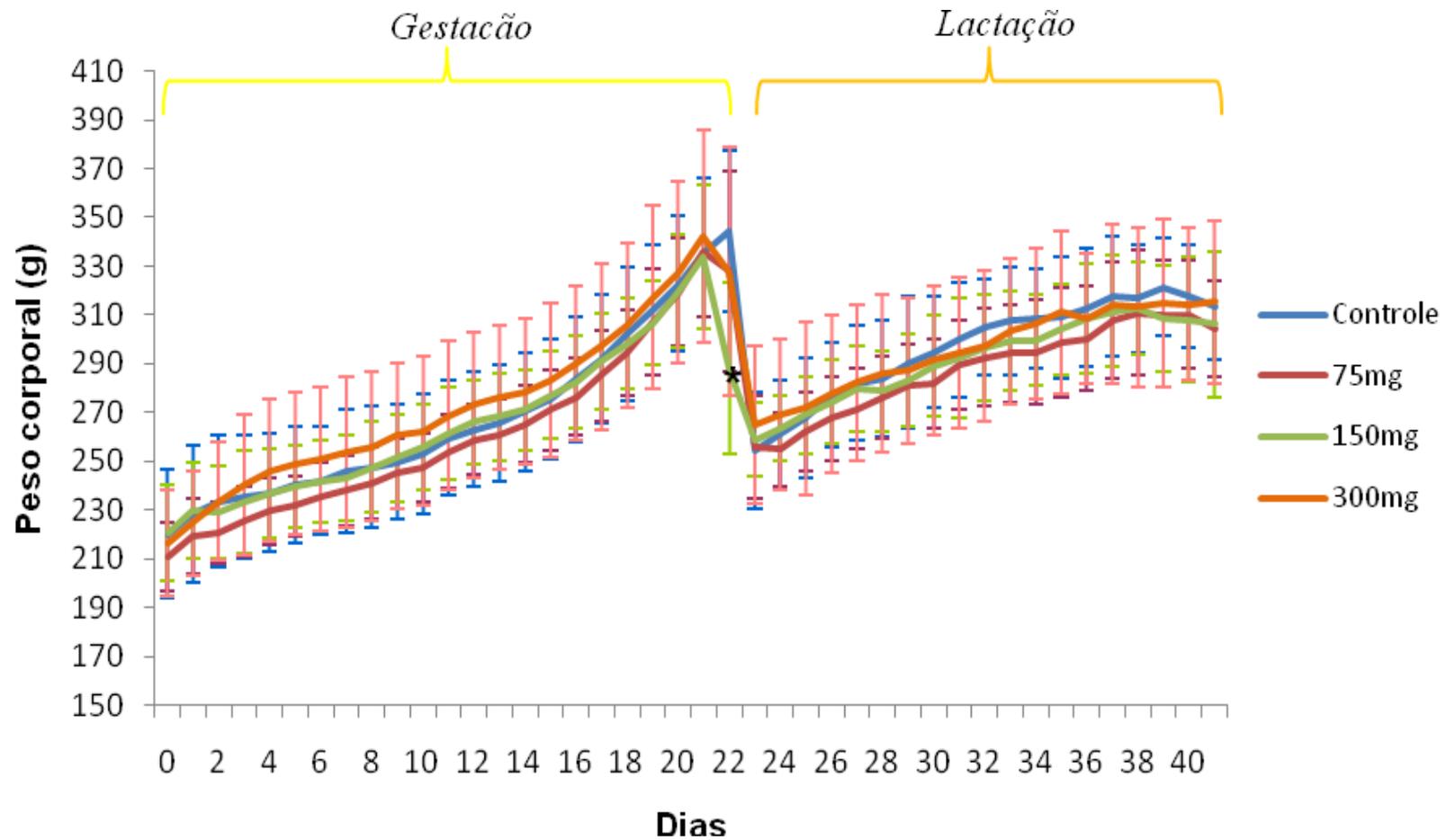


Figura 5.1: Alterações de peso corporal (em gramas) das mães tratadas com antimoniato de meglumina (0, 75, 150, 300 mg Sb<sup>+5</sup>/kg peso corporal /dia) durante gravidez, parto (em torno do dia 22 PN) e lactação até o desmame da prole (dia 21 de vida pós-natal). Os dados são expressos como médias  $\pm$  desvio padrão, e foram analisados a cada dia de tratamento pela ANOVA para amostras independentes complementada pelo teste de Dunnet. Diferenças foram consideradas significantes quando  $P < 0,05$ . Com exceção do dia 22 de tratamento (época do parto espontâneo) não foram detectadas diferenças entre os grupos. As fêmeas foram pesadas diariamente durante todo o período de tratamento.

O ganho de peso materno ( $\Delta g$ ) durante a gestação nos grupos controle e nos tratados com antimoniato de meglumina é mostrado também na Tabela 5.1.

A análise dos dados da Tabela 5.1 revela que durante a gravidez não houve diferenças de ganho de peso corporal materno entre os grupos tratados com antimoniato de meglumina e o grupo que recebeu apenas o veículo (grupo controle).

Tabela 5.1: Efeito do tratamento com antimoniato de meglumina sobre o ganho de peso corporal ( $\Delta g$ ) materno durante a gestação

Intervalo ( $\Delta g$ )	Antimoniato de Meglumina (mg Sb <sup>+5</sup> /kg de peso corporal/dia)			
	Controle	75	150	300
DG 7 – DG 0	25,9 ( $\pm 5,4$ )	27,0 ( $\pm 5,6$ )	22,3 ( $\pm 5,8$ )	27,2 ( $\pm 6,2$ )
DG 14 – DG 7	24,1 ( $\pm 5,7$ )	27,4 ( $\pm 6,6$ )	27,9 ( $\pm 6,0$ )	24,8 ( $\pm 5,3$ )
DG 21 – DG 14	65,0 ( $\pm 12,2$ )	71,0 ( $\pm 18,8$ )	63,0 ( $\pm 16,2$ )	63,7 ( $\pm 14,4$ )
DG 21 – DG 0	115,0 ( $\pm 19,8$ )	125,4 ( $\pm 26,1$ )	113,2 ( $\pm 18,3$ )	112,0 ( $\pm 20,1$ )
Mães (N)	9	12	10	9

Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio-padrão. Todos os dados foram analisados por ANOVA para amostras independentes. Não foram detectadas diferenças ( $P < 0,05$ ) entre grupos de dose.

Aproximadamente 10 dias após o desmame da prole, que foi realizado no dia 21 de vida pós-natal, as progenitoras foram pesadas e, após a eutanásia, os órgãos maternos foram retirados e pesados. Os resultados desta análise de peso corporal e órgãos maternos, realizada 10 dias após a última administração de antimoniato de meglumina, são apresentados na Tabela 5.2.

Como pode ser constatado na Tabela 5.2, a análise estatística não revelou diferenças entre os grupos tratados e o controle quanto aos pesos corporais e dos órgãos maternos examinados. Durante a necropsia das mães, não notamos também anormalidades dignas de registro em qualquer grupo experimental.

**Tabela 5.2:** Peso corporal e dos órgãos das mães no dia da eutanásia, i.e., aproximadamente 10 dias após a última dose de antimoniato de meglumina. Os pesos (média ± DP) são expressos em gramas.

Órgãos	Antimoniato de Meglumina (mg Sb <sup>+5</sup> /kg de peso corporal/dia)			
	Controle	75	150	300
Útero (vazio)	0,75 (±0,42)	0,72 (±0,25)	0,65 (±0,22)	0,85 (±0,39)
Fígado	10,13 (±1,01)	9,98 (±1,67)	9,58 (±0,79)	9,41 (±1,30)
Baço	0,83 (±0,34)	0,86 (±0,57)	0,79 (±0,12)	0,75 (±0,13)
Rim Esquerdo	0,96 (±0,11)	0,92 (±0,09)	1,07 (±0,25)	0,95 (±0,18)
Rim Direito	1,00 (±0,11)	0,97 (±0,10)	1,09 (±0,22)	1,02 (±0,19)
Coração	1,06 (±0,32)	0,95 (±0,10)	1,05 (±0,21)	1,04 (±0,15)
Peso Corporal	249,08 (± 26,9)	253,14 (±21,2)	226,74 (±35,3)	252,27 (±20,2)
Mães (N)	9	12	10	9

Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão. Todos os dados foram analisados por ANOVA para amostras independentes. Não foram detectadas diferenças (P<0,05) entre grupos tratados e grupo controle.

A Tabela 5.3 mostra dados obtidos por ocasião do parto espontâneo e o número de implantações no útero materno examinado após o desmame. O tratamento com antimoniato de meglumina a partir do dia 1 de gravidez (DG 1) não alterou o número total de filhotes nascidos, o número de filhotes viáveis (diferença entre número total de filhotes e número de mortos no primeiro dia) e a razão sexual dos filhotes nascidos espontaneamente. Não observamos também alterações do número de sítios de implantação no útero das mães, examinados pelo emprego do método de Salewski no dia da eutanásia, i.e., aproximadamente 31 dias após o parto.

**Tabela 5.3:** Efeitos do tratamento materno com antimoniato de meglumina sobre o tamanho da ninhada, mortalidade neonatal, razão sexual e número de implantações no útero materno

	<b>Antimoniato de Meglumina</b>			
	<b>(mg Sb<sup>+5</sup> /kg de peso corporal/dia)</b>			
	<b>Controle</b>	<b>75</b>	<b>150</b>	<b>300</b>
<b>Sítio de implantação (N)</b>	10,8 (±3,8)	12,77 (±3,2)	11,3 (±2,1)	12 (±1,6)
<b>Filhotes Viáveis (N)</b>	9,2 (±4,1)	9,46 (±3,5)	9,8 (±2,4)	6,3 (±3,0)
<b>Mortes no 1 PN (N)</b>	0,3 (±0,7)	1,6 (±3,0)	0	2,5 (±3,4)
<b>Razão sexual</b>	1,0 (0,1 - 7)	1,0 (0,5 - 2,0)	0,9 (0,3 - 1,6)	1,0 (0,3 - 2,0)
<b>Total de filhotes (N)</b>	9,5 (±4,3)	11,1 (±2,6)	9,8 (±2,4)	8,8 (±2,2)
<b>Peso corporal ( 1 PN) (g)</b>	7,1 (±1,4)	6,6 (±0,8)	6,2 (±0,5)	5,7 (±0,4)
<b>Ninhadas (N)</b>	9	12	10	9

Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão. E foram analisados por ANOVA. Os dados de razão sexual, que foram avaliados apenas para os filhotes viáveis, são apresentados por mediana (mínimo – máximo) . E foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis seguido do teste U de Mann-Whitney. Não foram detectadas diferenças (P<0,05) entre grupos tratados e grupo controle.

## **5.2 - Desenvolvimento pós-natal da prole de mães tratadas com antimoniato de meglumina durante a gravidez e lactação.**

A Figura 5.2 mostra o efeito do tratamento materno com antimoniato de meglumina sobre a evolução ponderal de todos os filhotes (Figura 5.2A) assim como apenas dos filhotes machos (Figura 5.2B) e das fêmeas (Figura 5.2C).

Como pode ser observado na Figura 5.2A, considerando conjuntamente o peso de filhotes machos e fêmeas, o peso foi menor no dia 50 pós-natal (grupo tratado com a maior dose; 300 mg  $Sb^{+5}$ /kg peso corporal materno/dia) e no dia 60 (grupos tratados com as doses de 150 e 300mg  $Sb^{+5}$  /kg de peso corporal materno/dia). Analisando separadamente o peso dos filhotes de cada sexo, não notamos diferenças entre os grupos nos casos dos machos (Figura 5.2B), enquanto as mesmas diferenças registradas na análise conjunta foram detectadas quando apenas os pesos dos filhotes do sexo feminino foram examinados (Figura 5.2C). E além destas, para as fêmeas também foi vista uma diferença para o grupo tratado com 75 mg  $Sb^{+5}$ /kg peso corporal materno/dia, no dia 60 PN. Esses resultados indicam que as fêmeas foram mais susceptíveis que os machos e exibiram menor ganho de peso pós-natal em resposta ao tratamento materno com antimoniato de meglumina durante a gravidez e lactação.

## Machos e Fêmeas

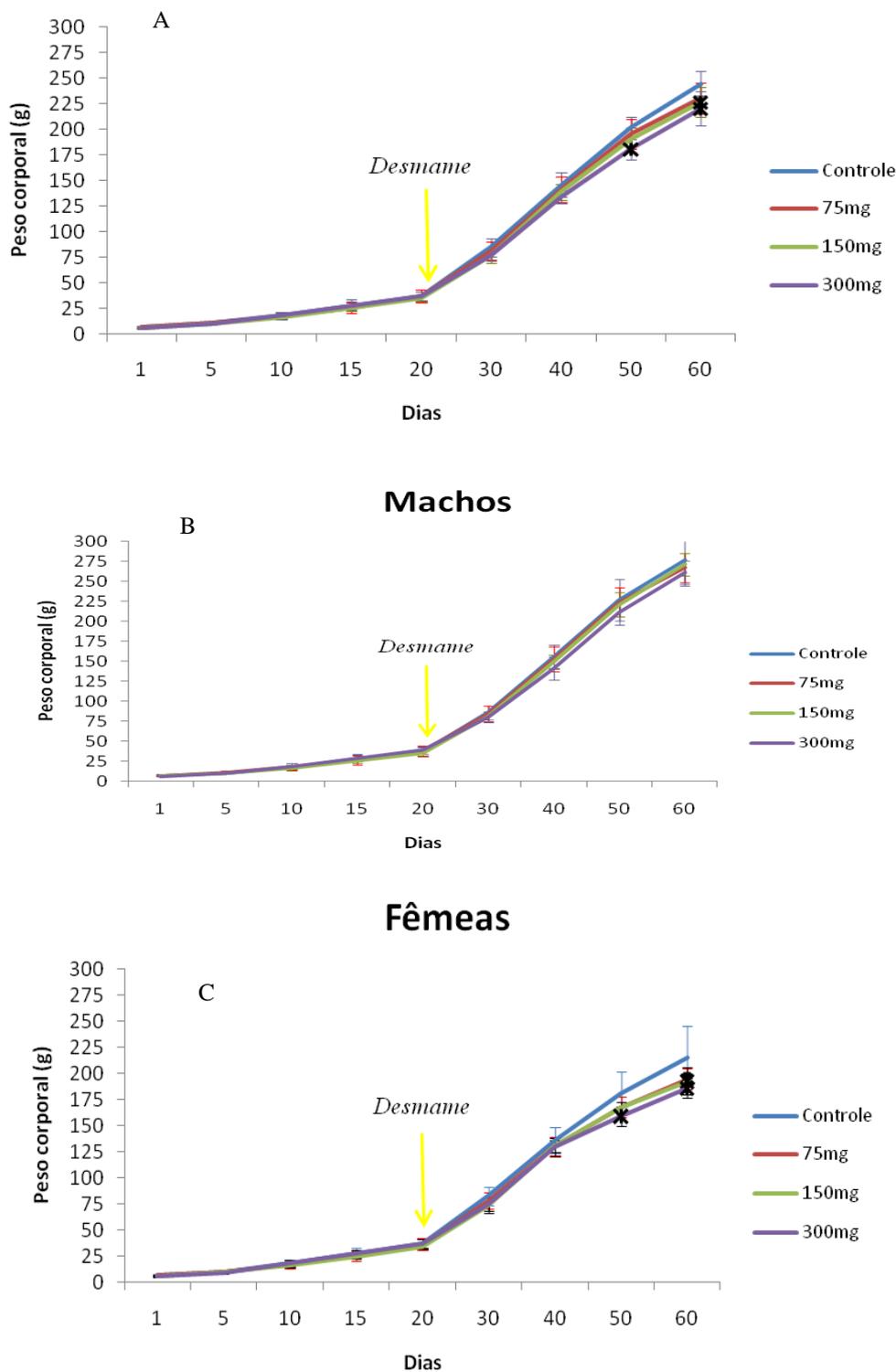


Figura 5.2: Evolução ponderal (gramas) da prole de mãe tratadas com antimoniato de meglumina (0, 75, 150, 300 mg Sb<sup>+5</sup>/kg peso corporal /dia) durante gravidez, parto e lactação até o desmame da prole (dia 21 de vida pós-natal). Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio-padrão. Todos os dados foram analisados por ANOVA seguido do teste *t* de Dunnet. O Gráfico **A** corresponde às médias dos pesos unindo todos os filhotes de cada dose; o Gráfico **B** apresenta os pesos apenas dos machos e o Gráfico **C** os pesos apenas das fêmeas. Até o desmame os animais foram pesados de 5 em 5 dias, e pós-desmame a periodicidade foi de 10 em 10 dias. Para atingir a dose pretendida, os volumes foram ajustados de acordo com o peso corporal materno a cada dia. As diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) estão indicadas com um asterisco (\*).

A Tabela 5.4 mostra os dias de aparecimento de marcos físicos do desenvolvimento – relativos ao período pré-desmame - dos filhotes das mães tratadas com antimoniato de meglumina durante a gravidez e lactação.

O efeito do tratamento materno com antimoniato de meglumina sobre o desenvolvimento neurocomportamental (dias de registro de reflexos) da prole exposta intra-útero e durante a lactação é apresentado na Tabela 5.5.

Como pode ser constatado nas Tabelas 5.4 e 5.5, a análise estatística indicou que o tratamento materno com antimoniato de meglumina não alterou os dias de aquisição de marcos do desenvolvimento somático e neurocomportamental da prole exposta.

**Tabela 5.4:** Efeito do tratamento materno com antimoniato de meglumina durante a gravidez e lactação sobre o desenvolvimento pós-natal da prole: Dias de aparecimento (mediana e valores mínimo e máximo) de marcos do desenvolvimento físico no período pré-desmame.

Marcos (dias)	Antimoniato de Meglumina (mg Sb <sup>+5</sup> /kg de peso corporal/dia)			
	Controle	75	150	300
<b>Descolamento de Orelhas</b>	3 (2,5 - 4)	3 (2 - 4)	3 (3 -4)	3 (2 - 4)
<b>Surgimento de Pelos</b>	7 (6- 9)	7 (6- 9)	5 (6 - 9)	6 (6 - 9)
<b>Erupção dos Incisivos</b>	12 (11 - 15,5)	12 (10 - 13)	12 (11 - 13)	12 (10 - 13)
<b>Abertura de Olhos</b>	16 (15 - 17,5)	16 (14 - 18)	16 (16 - 17)	16 (15 - 17)
<b>Descida de Testículos</b>	17 (17 - 19)	18 (16 - 19)	17,8 (17,5 - 19)	19 (19 - 19)
<b>Ninhadas (N)</b>	9	12	10	9

Os dados são apresentados por mediana (mínimo - máximo). E foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis seguido do teste U de Mann- Whitney. Devido a problemas na padronização da observação ou devido à ausência de filhotes machos na ninhada, o marco “descida de testículos” encontra-se aqui com um número reduzido de ninhadas. Sendo: 5 para o controle; 9 para menor dose; 4 para dose intermediária e 2 para maior dose.

**Tabela 5.5:** Efeito do tratamento materno com antimoniato de meglumina durante a gravidez e lactação sobre o desenvolvimento pós-natal da prole: Dias de registro (mediana e valores mínimo e máximo) de reflexos no período pré-desmame.

<b>Antimoniato de Meglumina</b>				
<b>(mg Sb<sup>+5</sup> /kg de peso corporal/dia)</b>				
<b>Marcos (dias)</b>	<b>Controle</b>	<b>75</b>	<b>150</b>	<b>300</b>
<b>Endireitamento Postural</b>	2 (1 - 3)	2 (1 - 4)	2 (1 - 5)	1,5 (1 - 3)
<b>Esquiva ao Abismo</b>	7 (4 - 7)	6 (4,5 - 11,5)	6,25 (5 - 8)	4 (3 - 6)
<b>Geotaxia Negativa</b>	7 (4,5 - 9)	6 (4,5 - 8)	7 (5 - 9,5)	6,5 (5 - 10,5)
<b>Reflexo de Preensão</b>	9 (7 - 10)	8,75 (7 - 10)	8,5 (6 - 11)	8 (4 - 9,5)
<b>Sobressalto Auditivo</b>	13 (12 - 14)	13 (12 - 14)	13 (13 - 14)	13 (13 - 14)
<b>Queda Livre</b>	18 (16,5 - 19)	18,5 (15,5 - 20)	18,5 (18 - 20)	19 (17 - 20)
<b>Ninhadas (N)</b>	9	12	10	9

Os dados são apresentados por mediana (mínimo - máximo). E foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis seguido do teste U de Mann-Whitney. Devido a problemas na padronização da observação, o marco “esquiva ao abismo” encontra-se aqui com um número reduzido de ninhadas. Sendo: 5 para o controle; 9 para menor dose; 4 para dose intermediária e 3 para maior dose.

O desenvolvimento neurocomportamental da prole exposta ao antimoniato de meglumina foi avaliado também pelo desempenho no teste do campo aberto. Na Tabela 5.6 são apresentados os resultados obtidos no teste campo aberto realizado com os filhotes machos com 25 dias de vida (25 PN), ou seja, poucos dias após o desmame e o encerramento da exposição materna ao antimoniato de meglumina. Os resultados relativos ao teste do campo aberto realizado na mesma época com as fêmeas é mostrado na Tabela 5.7. Tanto no caso da prole masculina, como da feminina, a análise estatística não detectou diferenças entre os grupos tratados com antimoniato de meglumina e aquele que recebeu apenas o veículo (grupo controle).

**Tabela 5.6:** Efeito do tratamento materno com antimoniato de meglumina durante a gravidez e lactação sobre o desenvolvimento neurocomportamental da prole masculina: Teste do campo aberto realizado no dia 25 de vida pós-natal (25 PN)

<b>Machos</b>	<b>Antimoniato de Meglumina</b> (mg Sb <sup>+5</sup> /kg de peso corporal/dia)			
	<b>Controle</b>	<b>75</b>	<b>150</b>	<b>300</b>
<b>Levantar (N)</b>	28,9 (±7,3)	24,4 (±11,1)	23,3 (±9,6)	21,3 (±9,1)
<b>Locomoção (N)</b>	108,2 (±20,1)	99,1 (±28,2)	81,5 (±22,4)	92,1 (±38,2)
<b>Tempo no centro da arena</b> (segundos)	18,3 (±9,9)	17,1 (±11,5)	15,0 (±14,6)	9,6 (±8,4)
<b>Limpeza (N)</b>	2,0 (±0,6)	1,8 (±0,4)	1,9 (±0,5)	2,1 (±1,2)
<b>Bolos fecais (N)</b>	4,3 (±0,6)	4,64 (±1,3)	4,45 (±1,0)	4,5 (±0,9)
<b>Ninhadas (N)</b>	9	12	10	9

Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão. Todos os dados foram analisados por ANOVA (p<0,05).

**Tabela 5.7:** Efeito do tratamento materno com antimoniato de meglumina durante a gravidez e lactação sobre o desenvolvimento neurocomportamental da prole feminina: Teste do campo aberto realizado no dia 25 de vida pós-natal (25 PN)

Fêmeas	Antimoniato de Meglumina (mg Sb <sup>+5</sup> /kg de peso corporal/dia)			
	Controle	75	150	300
<b>Levantar (N)</b>	38,0 (±14,8)	35,1 (±12,0)	35,7 (±11,4)	26,7 (±8,6)
<b>Locomoção (N)</b>	119,2 (±24,5)	115,3 (±24,8)	120,5 (±28,1)	117,0 (±30,6)
<b>Tempo no centro da arena (segundos)</b>	19,6 (±9,8)	16,5 (±12,0)	23,3 (±11,4)	18,3 (±10,9)
<b>Limpeza (N)</b>	1,6 (±0,4)	1,6 (±0,8)	1,7 (±0,3)	2,1 (±0,8)
<b>Bolos fecais (N)</b>	4,1 (±1,2)	4,1 (±1,0)	4,04 (±1,0)	3,7 (±1,6)
<b>Ninhadas (N)</b>	9	12	10	9

Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão. Todos os dados foram analisados por ANOVA (p<0,05).

### **5.3 - Desenvolvimento pós-desmame e fertilidade na vida adulta da prole de mães tratadas com antimoniato de meglumina durante a gravidez e lactação.**

Na Tabela 5.8 são encontrados os resultados relativos à maturação sexual da prole de mães tratadas com antimoniato de meglumina durante a gestação e lactação. Como pode ser verificado na Tabela 5.8, os dias da abertura vaginal, o dia do primeiro estro em fêmeas e o dia da separação prepucial em machos não foram alterados pelo tratamento das mães com antimoniato de meglumina. Nenhuma diferença entre grupos é evidente também quando são comparados os pesos corporais dos filhotes nos dias em que os referidos eventos foram registrados.

**Tabela 5.8:** Efeito do tratamento materno com antimoniato de meglumina durante a gravidez e lactação sobre os marcos do aparecimento da puberdade em fêmeas e machos. Dia (mediana, mínimo-máximo) em que o marco foi constatado e peso corporal (gramas, média  $\pm$ DP) do filhote no dia do evento.

	<b>Antimoniato de Meglumina (mg Sb<sup>+5</sup> /kg de peso corporal/dia)</b>			
	<b>Controle</b>	<b>75</b>	<b>150</b>	<b>300</b>
<b>Abertura Vaginal (dia)</b>	35 (33,5 - 37)	35 (33 - 38)	36,25 (33 - 39)	35 (31 - 37)
<b>Peso corporal no dia da abertura vaginal (g)</b>	113,1 ( $\pm$ 10,8)	108,7 ( $\pm$ 12,5)	110,3 ( $\pm$ 9,4)	100,4 ( $\pm$ 12,1)
<b>Primeiro Estro (dia)</b>	38 (36 - 41)	38,3 (37 - 42)	39 (37 - 42)	38 (36 - 41)
<b>Peso corporal no dia do primeiro estro (g)</b>	127,9 ( $\pm$ 15,6)	123,3 ( $\pm$ 7,7)	124,5 ( $\pm$ 8,9)	119,9 ( $\pm$ 10,3)
<b>Separação Prepucial (dia)</b>	38 (35 - 41)	40 (35 - 42,5)	39,3 (36,5 - 41,5)	38,5 (36,5 - 42)
<b>Peso corporal no dia da separação prepucial (g)</b>	141,6 ( $\pm$ 17,9)	148,4 ( $\pm$ 22,7)	141,6 ( $\pm$ 9,5)	134,6 ( $\pm$ 8,6)
<b>Ninhadas (N)</b>	9	12	10	9

Os dados relacionados com os marcos do desenvolvimento são apresentados por mediana (mínimo – máximo), e foram analisados pelo teste Kuskal-Wallis seguido do teste U de Mann-Whitney. Os dados relacionados aos pesos são apresentados por média  $\pm$  desvio-padrão, e foram analisados pelo ANOVA ( $p < 0,05$ ).

O desempenho dos filhotes das mães tratadas com antimoniato de meglumina no teste do campo aberto realizado na vida adulta (dia 60 PN) com as proles masculina e feminina é mostrado nas Tabelas 5.9 e 5.10, respectivamente. Na prole feminina, foi constatada uma redução da frequência do comportamento de “levantar” (rearing up) em relação ao controle nos grupos tratados com as duas maiores doses de antimoniato de meglumina (150 e 300 mg Sb<sup>+5</sup>/kg de peso corporal materno/dia). Não foram observadas, entretanto, diferenças entre os grupos em relação aos demais parâmetros registrados no teste (locomoção, tempo no centro da arena, frequência de “limpeza” (grooming), e número de bolos fecais. O teste do campo aberto realizado com a prole masculina na vida adulta (60PN) não revelou diferenças entre os grupos controle e tratados com antimoniato de meglumina em relação a qualquer um dos parâmetros registrados.

**Tabela 5.9:** Efeito do tratamento materno com antimoniato de meglumina durante a gravidez e lactação sobre o desempenho da prole masculina no teste do campo aberto realizado na vida adulta (dia 60 de vida pós-natal, 60 PN).

<b>Machos</b>	<b>Antimoniato de Meglumina</b>			
	<b>(mg Sb<sup>+5</sup> /kg de peso corporal/dia)</b>			
	<b>Controle</b>	<b>75</b>	<b>150</b>	<b>300</b>
<b>Levantar (N)</b>	44,0 (±9,7)	42,6 (±8,4)	37,7 (±15,6)	44,1 (±14,1)
<b>Locomoção (N)</b>	135,9 (±17,8)	145,0 (±23,0)	123,3 (±39,9)	159,1 (±41,6)
<b>Tempo no centro da arena (segundos)</b>	18,1 (±8,9)	15,3 (±9,6)	16,3 (±10,8)	21,0 (±11,6)
<b>Limpeza (N)</b>	1,4 (±0,7)	1,1 (±0,5)	0,9 (±0,3)	1,9 (±1,0)
<b>Bolos fecais (N)</b>	2,2 (±1,2)	3,0 (±1,8)	2,3 (±1,6)	0,8 (±1,1)
<b>Ninhadas (N)</b>	9	12	10	9

Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão. Todos os dados foram analisados por ANOVA seguido do teste *t* de Dunnet.

**Tabela 5.10:** Efeito do tratamento materno com antimoniato de meglumina durante a gravidez e lactação sobre o desempenho da prole feminina no teste do campo aberto realizado na vida adulta (dia 60 de vida pós-natal, 60 PN).

Fêmeas	Antimoniato de Meglumina (mg Sb <sup>+5</sup> /kg de peso corporal/dia)			
	Controle	75	150	300
<b>Levantar (N)</b>	64,0 (±13,7)	55,4 (±10,1)	50,1 (±10,9)*	39,1 (±9,5)*
<b>Locomoção (N)</b>	165,4 (±18,1)	159,4 (±21,9)	157,3 (±26,9)	152,2 (±19,7)
<b>Tempo no centro da arena (segundos)</b>	23,4 (±10,4)	17,3 (±8,4)	18,7 (±6,3)	15,8 (±5,9)
<b>Limpeza (N)</b>	1,5 (±0,4)	1,7 (±0,7)	1,2 (±0,6)	1,5 (±1,1)
<b>Bolos fecais (N)</b>	1,3 (±1,2)	1,5 (±1,5)	1,4 (±1,4)	0,7 (±0,7)
<b>Ninhadas (N)</b>	9	12	10	9

Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão. Todos os dados foram analisados por ANOVA seguido do teste *t* de Dunnet. As diferenças significativas (p<0,05) estão indicadas com um asterisco (\*).

A fertilidade e o desempenho reprodutivo da prole das mães tratadas com antimoniato de meglumina durante a gravidez e lactação foi examinado e os resultados são apresentados a seguir.

As fêmeas adultas, que haviam sido expostas intra-útero e durante lactação, foram acasaladas com machos de outras ninhadas do mesmo grupo de tratamento. Constatado o cruzamento, a evolução ponderal durante a gravidez foi acompanhada. No dia 21 de gestação, os fetos foram removidos por cesariana, foram determinados os sítios de implantação e foi retirado o fígado das mães.

Como pode ser visto na Tabela 5.11, não houve diferenças entre os grupos em relação ao ganho de peso durante a gravidez dessas fêmeas expostas ao antimoniato de meglumina in útero e durante a lactação.

Os dados obtidos por ocasião da cesárea das fêmeas que acasalaram e engravidaram de machos do mesmo grupo são apresentados na Tabela 5.12. Como pode ser constatado na Tabela 5.12, o tratamento materno com antimoniato de meglumina não alterou a fertilidade de fêmeas e machos expostos in útero e durante a lactação tal como indicado pelo tamanho de ninhada, número de sítios de implantação, número de reabsorções (embriofetividade), número de fetos vivos, peso corporal dos fetos e razão sexual. A única alteração observada foi uma discreta diminuição do peso do fígado das mães que descende das ratas tratadas, em todas as doses de antimoniato de meglumina durante a gravidez e lactação.

**Tabela 5.11:** Desempenho reprodutivo da prole exposta intra-útero e ao longo da lactação ao antimoniato de meglumina. Ganho de peso gestacional de fêmeas que acasalaram com machos do mesmo grupo.

<b>Antimoniato de Meglumina</b>				
<b>(mg Sb<sup>+5</sup> /kg de peso corporal/dia)</b>				
<b>Ganho de peso (Δ g)</b>	<b>Controle</b>	<b>75</b>	<b>150</b>	<b>300</b>
<b>21 - 0</b>	77,9 (±56,5)	109,5 (±20,9)	109,6 (±12,8)	108,8 (±16,1)
<b>(21 - peso útero) - 0</b>	42,8 (±9,3)	44,5 (±5,4)	39,4 (±3,4)	37,9 (±6,5)
<b>Ninhadas (N)</b>	9	12	10	9

Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão. Todos os dados foram analisados por ANOVA seguido do teste *t* de Dunnett.

**Tabela 5.12:** Desempenho reprodutivo da prole exposta intra-útero e ao longo da lactação ao antimoniato de meglumina. Dados obtidos por ocasião da cesariana de fêmeas que haviam engravidado de machos do mesmo grupo.

<b>Antimoniato de Meglumina</b>				
<b>(mg Sb<sup>+5</sup> /kg de peso corporal/dia)</b>				
	<b>Controle</b>	<b>75</b>	<b>150</b>	<b>300</b>
<b>Fetos viáveis</b>	11,00 (±1,49)	9,22 (±3,38)	9,81 (±1,50)	9,81 (±1,10)
<b>Sítios de implantação</b>	12,04 (±1,54)	10,00(±3,50)	10,83 (±1,38)	10,48 (±1,20)
<b>Reabsorções</b>	1,04 (±0,32)	0,78 (±0,63)	1,02 (±0,33)	0,67 (±0,61)
<b>Razão sexual dos fetos</b>	1,03 (0,48 - 1,14)	1,13 (0,71 - 1,80)	0,93 (0,61 - 1,15)	0,67 (0,38 - 1,11)
<b>Pesos dos Fetos</b>	4,96 (±0,21)	5,05 (±0,22)	4,90 (±0,24)	5,02 (±0,16)
<b>Peso do Fígado das fêmeas grávidas</b>	15,39 (±0,68)	13,24(±0,84)*	13,56(±0,98)*	12,31 (±1,60)*

Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão. E foram analisados por ANOVA seguido do teste *t* de Dunnett. Os dados de razão sexual são apresentados por mediana (mínimo – máximo). E foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis seguido do teste U de Mann-Whitney. As diferenças significativas (p<0,05) estão indicadas com um asterisco (\*).

Os dados relativos ao peso de órgãos reprodutivos masculinos da prole exposta in útero e durante a lactação ao antimoniato de meglumina também não mostram diferenças entre grupos tratados e controles (Tabela 5.13).

Como pode ser constatado na Tabela 5.13 exceto pelo menor peso do fígado, na menor e na maior dose de antimoniato de meglumina, não foram evidenciadas diferenças de peso corporal ou de órgãos (reprodutivos) entre os grupos.

**Tabela 5.13:** Desempenho reprodutivo da prole exposta intra-útero e ao longo da lactação ao antimoniato de meglumina. Peso corporal e peso do fígado e dos órgãos reprodutivos de machos (em gramas).

<b>Antimoniato de Meglumina</b>				
<b>(mg Sb<sup>+5</sup> /kg de peso corporal/dia)</b>				
	<b>Controle</b>	<b>75</b>	<b>150</b>	<b>300</b>
<b>Peso Corporal (g)</b>	428,33 (±31,58)	400,33 (±25,91)	421,88 (±26,66)	396,36 (±26,26)
<b>Próstata (g)</b>	0,42 (±0,06)	0,40 (±0,05)	0,40 (±0,04)	0,39 (±0,08)
<b>Testículo Direito (g)</b>	1,74 (±0,12)	1,71 (±0,19)	1,84 (±0,12)	1,81 (±0,15)
<b>Testículo Esquerdo (g)</b>	1,73 (±0,15)	1,70 (±0,18)	1,84 (±0,12)	1,81 (±0,15)
<b>Epidídimo Direito (g)</b>	0,59 (±0,04)	0,56 (±0,05)	0,61 (±0,04)	0,62 (±0,05)
<b>Epidídimo Esquerdo (g)</b>	0,58 (±0,05)	0,56 (±0,05)	0,60 (±0,03)	0,60 (±0,05)
<b>Vesícula Seminal (g)</b>	1,69 (±0,17)	1,71 (±0,24)	1,78 (±0,15)	1,65 (±0,19)
<b>Vesícula Seminal Vazia (g)</b>	0,83 (±0,07)	0,81 (±0,14)	0,82 (±0,07)	0,72 (±0,10)
<b>Fígado (g)</b>	15,16 (±1,00)	13,3 (±0,98)*	14,45 (±1,23)	13,08 (±1,22)*
<b>Ninhadas (N)</b>	9	12	10	9

Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão. Todos os dados foram analisados por ANOVA seguido do teste *t* de Dunnet. As diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) estão indicadas com um asterisco (\*).

Na Tabela 5.14 constam os resultados relacionados ao número de espermátides por epidídimo; número de espermatozóides por testículo; número de espermatozóides por cada grama de testículo; contagem espermática diária e tempo de trânsito espermático. A análise estatística não revelou diferenças entre os grupos quanto a esses parâmetros relevantes para a fertilidade masculina.

**Tabela 5.14:** Fertilidade da prole masculina exposta intra-útero e ao longo da lactação ao antimoniato de meglumina. Contagem de espermátides e espermatozóides, produção espermática diária e tempo de trânsito espermático.

<b>Antimoniato de Meglumina</b>				
<b>(mg Sb<sup>+5</sup> /kg de peso corporal/dia)</b>				
	<b>Controle</b>	<b>75</b>	<b>150</b>	<b>300</b>
<b>Número de espermátides por testículo (x106)</b>	176,5 (±15,9)	182,4 (±22,5)	190,4 (±19,8)	201,8 (±28,8)
<b>Número de espermátides por grama de testículo (x106)</b>	107,8 (±7,92)	104,4 (±12,3)	104,6 (±11,6)	111,7 (±18,1)
<b>Número de espermatozóides por epidídimo (x106)</b>	162,5 (±37,2)	167,0 (±40,3)	172,2 (±23,6)	166,1 (±22,9)
<b>Contagem espermática diária (x106/testículo/dia)</b>	30,6 (±2,4)	30,5 (±2,8)	31,5 (±3,2)	33,1 (±4,7)
<b>Tempo de trânsito espermático (em dias)</b>	5,6 (±1,2)	5,6 (±1,0)	5,6 (±0,7)	5,0 (±1,0)
<b>Ninhadas (N)</b>	9	12	10	9

Os dados são apresentados como média ± desvio-padrão. Todos os dados foram analisados por ANOVA seguido do teste *t* de Dunnet.

## 6 – DISCUSSÃO

Os antimoniais pentavalentes, antimoniato de meglumina e estibogluconato de sódio, foram introduzidos no mercado há mais de 60 anos, mas ainda hoje são considerados medicamentos de primeira escolha para o tratamento da leishmaniose, uma das doenças mais negligenciadas da atualidade. Por afligirem principalmente populações de baixa renda e países pobres, o mercado para medicamentos destinados a tratar as leishmanioses não é lucrativo e assim sendo o desenvolvimento de fármacos para essas doenças não desperta o interesse da indústria farmacêutica<sup>74</sup>. Da mesma forma, não há a preocupação em investir em estudos que venham a preencher as várias lacunas na base de dados farmaco-toxicológicos disponíveis para avaliar a segurança dos antimoniais pentavalentes. Os estudos da toxicidade pré-natal e da toxicidade para indivíduos jovens, ainda em desenvolvimento, são exigidos para qualquer medicamento que se pretende introduzir no mercado. Esses estudos nunca foram realizados com os antimoniais pentavalentes porque não eram exigidos na época em que surgiram e porque nunca houve por parte da indústria interesse em investir nesses fármacos. Numa tentativa de contribuir para aperfeiçoar a base de dados toxicológicos sobre os antimoniais pentavalentes, investigamos nesse trabalho os efeitos da administração materna de antimoniato de meglumina durante a gravidez e amamentação sobre o desenvolvimento da prole com ênfase na maturação neurocomportamental e na fertilidade e desempenho reprodutivo da prole exposta na vida adulta.

De acordo com o fabricante, o antimoniato de meglumina (Glucantime<sup>®</sup>) tem uma produção de aproximadamente cinco milhões de ampolas por ano. Segundo os produtores deste medicamento (Sanofi-Aventis) ele estaria inserido no que a empresa eufemisticamente denomina como “Política de Acesso a Medicamentos” que teria como lema: “sem lucro – sem prejuízo”<sup>75,76</sup>. Por não gerar lucro, o investimento torna-se inexistente, e esse é um dos motivos para a pouca informação sobre este remédio essencial no nosso país onde a leishmaniose é endêmica.

A leishmaniose pode se manifestar de diversas formas. A doença visceral (ou calazar) é a forma clínica mais severa afetando seriamente o estado geral do indivíduo e evoluindo para o óbito se não for tratada. As formas cutâneas e mucoso-cutâneas podem deixar sequelas que desfiguram o paciente e causam prejuízos econômicos e sociais. Neste contexto foi relatado que, em mulheres grávidas, as lesões cutâneas tendem a serem maiores e a apresentar aparência atípica<sup>77</sup>. Considerando a escassez de dados sobre segurança dos antimoniais pentavalentes, e levando em conta que o antimoniato de

meglumina continua sendo o medicamento de primeira linha para esta doença no Brasil e em outros países em desenvolvimento; é importante que se esclareça melhor o risco do uso deste medicamento durante a gravidez e em crianças.

Como salientamos são poucos os estudos envolvendo o uso do antimoniato de meglumina durante a gravidez, tanto em humanos quanto em animais. A necessidade deste tipo de estudo é cada vez mais evidente tendo em vista a expansão da leishmaniose (o que aumenta as probabilidades de infecção durante a gravidez), o fato de a forma visceral requerer pronto tratamento e a falta de consenso sobre o melhor esquema terapêutico neste período.

Miranda *et al*<sup>5</sup> e colaboradores relataram que, quando o antimoniato de meglumina foi administrado a ratas grávidas, o antimônio atravessou a placenta e atingiu concentrações expressivas no sangue do feto. Há também evidências de que, quando ratas nutrizas são tratadas com este antimonial pentavalente, o antimônio passa para o leite materno<sup>6</sup>. O antimônio presente no leite materno parece ser absorvido no trato gastro-intestinal do lactente, porque este metal foi detectado no sangue de ratos jovens cujas mães haviam sido tratadas com antimoniato de meglumina durante o período de amamentação<sup>6</sup>. Essas observações indicam que o tratamento materno durante a gravidez e amamentação com antimonias pentavalentes resulta em exposição significativa do feto e dos lactentes ao fármaco.

Este estudo em ratos foi desenhado para investigar se essa exposição ao antimônio resultante do tratamento materno com antimonias pentavalentes afetaria o desenvolvimento pós-natal dos filhotes, particularmente a maturação neuro-comportamental e a fertilidade e desempenho reprodutivo da prole exposta na vida adulta.

Os resultados mostraram que o tratamento com antimoniato de meglumina não alterou o peso corporal, o ganho de peso e o peso de órgãos maternos durante a gravidez e lactação. Não foram evidenciados quaisquer outros indícios de toxicidade materna decorrentes do tratamento. Portanto, nas doses, via de administração e esquema utilizado, pode-se dizer que o antimoniato de meglumina não produziu efeitos adversos nas mães. Não foram observadas também alterações atribuíveis ao tratamento em relação ao tamanho de ninhada ao nascimento, ao número de neonatos viáveis, ao peso corporal dos filhotes no dia do nascimento, ao número de sítios de implantação no útero (examinados após o desmame dos filhotes quando as mães foram mortas e necropsiadas). Este conjunto de dados sugere que o tratamento materno durante a gravidez não produziu perdas gestacionais (mortalidade embrio-fetal) nem retardou o

crescimento intra-uterino. Em síntese não foi evidenciado nem toxicidade materna nem efeito embriotóxico atribuíveis ao tratamento com antimoniato de meglumina, porém existe uma tendência a uma embriotoxicidade, que precisa ser confirmada.

Mesmo após o longo período de exposição deste estudo (incluindo gestação e lactação), os resultados para ausência de toxicidade materna são consistentes com os de Alkhawajah *et al*<sup>3</sup>, de Paumgartten e Chahoud<sup>4</sup> e de Miranda *et al*<sup>5</sup>, apesar do período tratamento nestes trabalhos ter sido mais curto.

O tratamento com antimoniais pentavalentes tem sido apontado como causa de abortos e partos prematuros em humanos<sup>78,9</sup>. Porém, neste estudo não foi possível verificar aumento do número de perdas pré- ou pós-implantação, que resultariam em menor tamanho de ninhadas e menor número de filhotes viáveis nos grupos tratados. Como os relatos em humanos dizem respeito primordialmente a relatos de casos, eles não permitem concluir que o tratamento com antimoniais pentavalentes durante a gravidez não é seguro.

Os resultados desse estudo também mostraram que o tratamento materno com antimoniato de meglumina durante a gravidez e lactação não afetou o ganho de peso da prole masculina, mas reduziu discreta, porém significativamente, o ganho de peso da prole feminina em todos os grupos que receberam antimoniato de meglumina em relação ao grupo controle tratado apenas com o veículo. O peso corporal que é um bom indicador do desenvolvimento físico dos filhotes foi registrado sistematicamente até o dia pós-natal 60 (60 PN). Os resultados indicaram, portanto, que as fêmeas foram aparentemente mais sensíveis à exposição - via organismo materno - ao antimônio.

O efeito adverso da exposição continuada ao antimônio sobre a evolução ponderal foi descrito por Schroeder *et al*<sup>79</sup> em camundongos. Esses autores expuseram camundongos, a partir do desmame, ao antimônio adicionado a água de beber na concentração de 5ppm. Quando os animais atingiram 150 dias de vida foi verificada significativa redução de peso corporal de machos e fêmeas em relação aos respectivos controles, sendo que o deficit ponderal nestas últimas foi mais acentuado. Decréscimos importantes de peso foram observados entre os machos na idade de 540 dias de vida e entre as fêmeas aos 360 e 540 dias de vida. Pode-se dizer que os dados desses autores sugerem que, também neste estudo com camundongos, as fêmeas foram mais sensíveis à exposição ao antimônio. Os resultados de Schroeder *et al*<sup>79</sup>, entretanto referem-se a outra espécie, outra via e método de administração, ao antimônio inorgânico e a outros períodos de exposição.

Nesse estudo não observamos efeitos do tratamento materno com antimoniato de meglumina sobre a cronologia do aparecimento dos marcos físicos do desenvolvimento pós-natal antes e após o desmame. Embora o aparecimento desses parâmetros seja fortemente relacionado ao peso corporal, o discreto déficit de ganho de peso corporal notado entre as fêmeas dos grupos tratados com as duas maiores doses não se refletiu em atraso do aparecimento dos marcos somáticos examinados. Uma possível interpretação para este fato é a maior sensibilidade do peso corporal tanto como desfecho quanto pela natureza da variável (peso, variável contínua e dia, variável discreta) e o fato dos marcos se referirem à época (pré-desmame) em que essas diferenças ponderais ainda não eram evidentes. Da mesma forma que os marcos somáticos, os reflexos e o teste do campo aberto realizado logo após o desmame (dia 25 PN), não evidenciaram qualquer diferença entre filhotes dos grupos tratados com antimoniato de meglumina e os respectivos controles tratados apenas com o veículo. Esses resultados sugerem que exceto pelo menor peso corporal das fêmeas anteriormente mencionado, não encontramos indícios de efeitos adversos do tratamento materno durante a gravidez e lactação sobre o desenvolvimento pós-natal da prole.

É conhecido que o antimônio e o arsênio são semelhantes quanto a várias propriedades químicas e tóxico-cinéticas. O arsênio, por exemplo, é transferido pela placenta e através do leite materno a filhotes de mamíferos; tende a se acumular em órgãos muito vascularizados (como fígado e rins); e suas espécies trivalentes são mais tóxicas que as pentavalentes, da mesma forma como ocorre para o antimônio<sup>80,81</sup>. Entretanto, estudos realizados com compostos de arsênio demonstraram que estes podem atrasar o descolamento de orelhas e a abertura de olhos em animais tratados<sup>82, 83</sup>.

No presente estudo avaliamos alguns parâmetros de desenvolvimento na puberdade. Os resultados encontrados não evidenciaram qualquer alteração da cronologia de aparecimento dos marcos da maturação sexual analisados (abertura de vagina, aparecimento do primeiro estro, separação prepucial) quer em machos quer em fêmeas o que sugere que o antimoniato de meglumina não causou efeitos expressivos nos mecanismos endócrinos subjacentes.

O teste campo aberto, que mede atividade motora, habituação e exploração de um novo ambiente, foi realizado também quando a prole exposta atingiu a fase adulta (dia 60 PN). Nesse teste realizado no início da vida adulta, foi possível detectar diferença em relação ao grupo controle para o parâmetro “levantar” (*rearing up*) que mede a exploração vertical do animal<sup>84</sup>, porém não observamos efeito na exploração horizontal, que é refletida pelo número de quadrantes percorridos, bem como em outro

parâmetro registrado no teste do campo aberto. Tal como o deficit de peso anteriormente comentado, esta diminuição de exploração vertical ocorreu somente entre as fêmeas, mas nos grupos tratados com as duas doses mais elevadas (150 e 300 mg Sb<sup>+5</sup>/kg de peso corporal materno/dia) e por volta do dia 60 PN. Aparentemente, essa redução foi dose relacionada, sendo a exploração vertical menor no grupo tratado com a maior dose.

Tanto o efeito sobre o ganho de peso quanto sobre um dos parâmetros da exploração no campo aberto observado com fêmeas foi relativamente discreto – embora tenha sido consistente. Antes de aprofundar a possível significação desse achado em relação à segurança do antimoniato de meglumina para fêmeas é necessário confirmá-lo, aumentando o número de ninhadas analisadas.

São conhecidas as diferenças de comportamento entre machos e fêmeas. É descrito que as fêmeas exploram e se locomovem mais, e realizam mais exploração vertical (“levantar”) do que os machos, o que possivelmente traduz maior motivação em aprender sobre um novo ambiente (que neste caso é a arena do teste campo aberto) ou menos neofobia<sup>85,86,87,88</sup>. No presente trabalho não comparamos estatisticamente o comportamento de machos e fêmeas, porém, ao observar os resultados é possível perceber a tendência dos machos se movimentarem e explorarem menos o que é consistente com a literatura.

A exploração pode ser definida como uma atividade de investigação, que leva o animal a obter informações sobre o ambiente em que ele se encontra e os ratos são animais territorialistas, e dependem acentuadamente do conhecimento sobre o ambiente para sobreviverem. A exploração vertical (“*rearing up*”) leva à ampliação de informações adquiridas pelo animal, pois amplia o seu campo de visão e permite perceber de forma mais eficiente o ambiente que o cerca<sup>89,90</sup>.

A prole foi avaliada também quanto à fertilidade e desempenho reprodutivo na vida adulta. Exceto pelo peso do fígado materno discretamente menor no dia em que as grávidas foram submetidas à cesariana, não notamos nenhuma diferença entre os grupos tratados e controle no teste de fertilidade realizado com as proles na vida adulta. Não registramos nenhuma redução do tamanho das ninhadas, aumento de embriofetalidade ou alteração do número de sítios de implantação reabsorções, ou qualquer indício de comprometimento do desempenho reprodutivo nas gestações que resultaram dos acasalamentos das proles expostas. A mencionada diminuição de peso do fígado materno é um dado de significado obscuro (possivelmente relacionado ao metabolismo energético).

Os resultados da análise dos pesos dos órgãos da prole masculina foram de certa forma análogos aos obtidos com as fêmeas, uma vez que a única diferença foi encontrada para os fígados. No caso dos machos, porém, a redução ocorreu apenas nas doses de 75 e 300 mg Sb<sup>+5</sup>/kg de peso corporal/dia.

Miranda *et al*<sup>5</sup> verificou diminuição do peso absoluto e relativo do fígado fetal, para a dose de 300mg Sb<sup>+5</sup>/kg de peso corporal materno/dia, em um tratamento realizado do dia 1 ao dia 20 de gravidez. Esta redução foi aparentemente dose-relacionada. Em que pese as diferenças entre os estudos, a diminuição do peso do fígado aparece consistentemente entre os expostos continuamente ao antimoniato de meglumina merecendo assim ser melhor explorada em estudos futuros. Há muito poucos dados sobre efeitos no tecido hepático de tratamentos longos com antimoniais pentavalentes. Digno de nota é o fato de o fígado ser um dos órgãos que mais acumula antimônio<sup>91, 92</sup>.

Como ratos e outros roedores produzem uma quantidade de espermatozóides que excede a necessária para assegurar uma eficiência de 100% em engravidar fêmeas em testes de fertilidade, comprometimentos menos drásticos da espermatogênese podem não ser detectados nesses testes. Assim, para complementar as avaliações de possíveis efeitos adversos sobre a fertilidade masculina realizamos a contagem espermática no testículo, e a contagem de espermatozóides no epidídimo. É conhecido que em primatas incluindo os seres humanos, alterações discretas da espermatogênese podem ter reflexos importantes na fertilidade do indivíduo<sup>93,94</sup>. A produção espermática diária pode indicar um aumento na morte ou degeneração das espermátides e o tempo de trânsito espermático complementa a produção espermática diária, e está associando à taxa de movimentação das espermátides pelo ducto deferente<sup>95</sup>. A análise dos dados relacionados à fertilidade da prole masculina realizada neste estudo não revelou qualquer indício de efeito adverso atribuível ao tratamento materno com antimoniato de meglumina.

Em linhas gerais, os resultados desse estudo sugerem que a prole de ratas Wistar tratadas com o antimoniato de meglumina durante a gravidez e lactação até o desmame não apresenta prejuízo evidente da maturação somática, neurocomportamental, fertilidade e desempenho reprodutivo na vida adulta.

## 7 - CONCLUSÕES

- O tratamento das mães com antimoniato de meglumina, por via subcutânea e em doses até 300 mg  $Sb^{+5}$ /kg de peso corporal/dia, durante a gravidez e lactação até o desmame, não causou toxicidade materna.
- Ao nascimento, não foram evidenciados indícios de efeitos adversos sobre o desenvolvimento intra-uterino atribuíveis ao tratamento materno com antimoniato de meglumina, por via subcutânea e em doses até 300 mg  $Sb^{+5}$ /kg de peso corporal/dia, durante a gravidez.
- O tratamento materno com antimoniato de meglumina, por via subcutânea e em doses até 300 mg  $Sb^{+5}$ /kg de peso corporal/dia, não afetou o desenvolvimento neurocomportamental da prole exposta intra-útero e durante a lactação.
- O tratamento materno com antimoniato de meglumina, por via subcutânea e em doses até 300 mg  $Sb^{+5}$ /kg de peso corporal/dia, Não alterou a cronologia de aquisição dos marcos do desenvolvimento físico, de maturação sexual, e da fertilidade examinados neste estudo;
- O tratamento materno com antimoniato de meglumina durante a gravidez e lactação, produziu, em todos os grupos tratados, um discreto e dose-relacionado deficit ponderal entre as fêmeas que foi detectável quando estas alcançam 60 dias de vida (60 PND), e na maior dose no dia 50 PN. Este efeito não foi notado entre os machos.
- O tratamento materno com antimoniato de meglumina durante a gravidez e lactação, reduziu nas duas maiores doses e de forma dose-relacionada, a exploração vertical (frequência de “levantar”) no teste do campo aberto realizado com as fêmeas na idade adulta (60 PN). Os outros parâmetros exploratórios registrados no teste de campo aberto não foram alterados. Este efeito não foi observado entre os machos.
- Foi detectada uma discreta diminuição do peso dos fígados das proles masculina e feminina dos grupos tratados com antimoniato de meglumina quando estes ratos foram eutanasiados na idade adulta.

## 8 – REFERÊNCIAS

1. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Formulário Terapêutico Nacional. Brasília. Ministério da Saúde. 2008.
2. ZUMLA. Alimuddin, Reflection & Reaction -Drugs for neglected diseases. The Lancet Infectious Diseases. 2002; 2: 393.
3. ALKHAWAJAH A.M.; JAIN S.; LARBI E.B. Effects of antimony compounds on foetal development in rats. Journal of Applied Animal Research 1996;10:15-24.
4. PAUMGARTTEN F.J.R.; CHAHOUD I. Embriotoxicity of meglumine antimoniate in rat. Reproductive Toxicology. 2001; 5:327-331.
5. MIRANDA E.S.; MIEKELEY N.; DE-CARVALHO R.R.; PAUMGARTTEN F.J. Developmental toxicity of meglumine antimoniate and transplacental transfer of antimony in the rat. Reproductive Toxicology. 2006;21(3):292-300.
6. FRIEDRICH K. Estudos da cinética do antimônio e alterações de citocromos P450 hepáticos em primatas e ratos tratados com antimoniato de meglumina. dissertação (Doutorado) – Escola Nacional de Saúde Pública. Fiocruz. Rio de Janeiro. 2008.
7. BERMAN J.D.; MELBY P.C.; NEVA F.A. Concentration of Pentostam® in human breast milk. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1989;83:784-785.
8. UTILI R.; RAMBALDI A.; TRIPODI M.F.; ANDREANA A. Visceral leishmaniasis during pregnancy treated with meglumine antimoniate. Infection. 1995;23(3):182-183.
9. SILVEIRA B.P.; SOBRINHO J.A.; LEITE L.F.; SALES M.N.A.; GOUVEIA M.S.A.; MATHIAS R.L.; FILHO R.A.G.; BARBOSA S.M. Parto prematuro após uso

de antimonial pentavalente: relato de um caso. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2003;36(4):523-525.

10. KRISHNAN L.; GUILBERT L.J.; RUSSELL A.S.; WEGMANN T.G.; MOSMANN T.R.; BELOSEVIC M. Pregnancy impairs resistance of C57BL/6 mice to leishmania major infection and causes decreased antigen-specific IFN-gamma response and increased production of T helper 2 cytokines. *The Journal of Immunology*. 1996;156(2):644-652.

11. DANTAS-TORRES F.E.; BRANDÃO-FILHO S.P. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no estado de Pernambuco. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2006;39(4):352-356.

12. MENDES W.S.; SILVA A.A.M.; TROVÃO J.R.; SILVA A.R.; COSTA J.M.L. Expansão espacial da leishmaniose visceral americana em São Luis, Maranhão, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2002;35(3):227-231.

13. CAMARGO- NEVES V. A. Leishmaniose visceral americana no estado de São Paulo: situação atual. Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN), Secretaria de Estado de Saúde de São Paulo (SES/SP). 2007;4:48.

14. MESTRE G.L.C.; FONTES J.F. A expansão da epidemia da leishmaniose visceral no estado de Mato Grosso, 1998-2005. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2007;40(1):42-48.

15. FIGUEIRÓ-FILHO E.A.; DUARTE G.; EL-BEITUNE P.; QUINTANA S.M.; MAIA T.L. Visceral leishmaniasis (Kala-Azar) and pregnancy. *Infect Dis Olistet Gynecol*. 2004;12:31-40.

16. MORAES R.G. Parasitologia & micologia humana. *Cultura Médica: Guanabara Koogan*. 5ª Ed. Rio de Janeiro. 2008.

17. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso. 6ª. ed. rev. Brasília : Ministério da Saúde. 2005.
18. LINDOSO J.A.L.; LINDOSO A.A.B.P. Neglected tropical diseases in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2009;51(5):247-253.
19. TAVARES W.; MARINHO L.A.C. Rotinas de diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas e parasitárias. Atheneu. 2005.
20. FEITOSA, M.M. Leishmaniose visceral: facetas da doença. In: Congresso Paulista de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais, São Paulo: Anclivepa. 2006;6:57-58.
21. MURRAY H.W.; BERMAN J.D.; SARAIVA N.G. Advances in leishmaniasis. *The Lancet*. 2005;366:1561-1577.
22. DESJEUX P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol. Infectious Diseases*. 2004;27:305-318.
23. YANIK M.; GUREL M.S.; SIMESEK Z. The psychological impact of cutaneous leishmaniasis. *Clinical and Experimental Dermatology*. 2004;29:464-467.
24. BLUM J.; DESJEUX P.; SCHWARTZ E.; BECK B.; HATZ C. Treatment of cutaneous leishmaniasis among travelers. *Journal of Antimicrobiological Chemotherapy*. 2004;53:158-166.
25. WEINA P. J.; NEAFIE R. C.; WORTMANN G.; POLHEMUS M.; ARONSON N. E. Old world leishmaniasis; an emerging infection among deployed US military and civilian workers. *Clinical Infectious Diseases*. 2004; 39:1674-1680.
26. MACHADO-COELHO G.L.L.; CAIAFFA W.T.; GENARO O.; MAGALHAES P. A.; MAYRINK W. Risk factors for mucosal manifestations of american cutaneous leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2005;99: 55-61.
27. REY L. Bases da parasitologia médica. 2ª Ed. Guanabara Koogan. 2002.

28. BERMAN J.D. Chemotherapy for leishmaniasis: Biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. *Reviews of Infectious Diseases*. 1988; 10(3):560-586.
29. LITTLE S.E. Protozoal diseases. leishmaniasis. In GREENE, C. E. *Infectious diseases of the dog and cat*. 3th ed. St. Louis: Saunders. 2006.
30. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana*. 2 ed – Brasília. Editora do Ministério da Saúde. 2007.
31. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral*. Brasília. Editora do Ministério da Saúde. 2006.
32. DATASUS. Sistema de agravos de notificação. Indicadores de morbidade e fatores de risco. <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/ldb2008/matriz.htm>. Acesso em 05 de abr. 2010.
33. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Leishmaniose Visceral Grave: Normas e Condutas*. Brasília. Editora do Ministério da Saúde. 2006.
34. NEVES I. *Diagnóstico e tratamento das doenças infectuosas e parasitárias*. Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro – RJ. 1978.
35. MARSDEN P.D. Pentavalent antimonials: Old drugs for new diseases. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1985;18(3):187-198.
36. ROBERTS W.L.; MCMURRAY W.J.; RAINEY P.M. Characterization of the Antimonial antileishmanial agent meglumine antimonate (glucantime). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1998;42(5):1076–1082.
37. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos.

Relação Nacional de Medicamentos Essenciais – Rename. Brasília: Editora do Ministério da Saúde. 2009.

38. FRÉZARD F.; DEMICHELI C.; FERREIRA C.S.; COSTA M.A.P. Glutathione-induced conversion of pentavalent antimony to trivalent antimony in meglumine antimoniate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001;45:913.

39. FERREIRA C.S.; MARTINS P.S.; DEMICHELI C.; BROCHU C.; OUELLETTE M.; FRÉZARD F. Thiol-induced reduction of antimony(V) into antimony(III): a comparative study with trypanothione, cysteinyl-glycine, cysteine and glutathione. *BioMetals*. 2003;16:441.

40. BALAÑA-FOUCE R.; REGUERA R.M.; CUBRÍA J. C.; ORDÓÑEZ D. The pharmacology of leishmaniasis. *General Pharmacology*. 1998;30:435-443.

41. OUELLETTE M.; DRUMMEL S.J.; PAPADOPOULOU B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resist. Updat*. 2004; 7(4-5):257-266.

42. BROCHU C.; WANG J.; ROY G.; MESSIER N.; WANG X.Y.; SARAVIA N. G.; OUELLETTE M. Antimony uptake systems in the protozoan parasite leishmania and accumulation differences in antimony-resistant parasites. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2003;47(10):3073-3079.

43. BERMAN J.; WADDELL D.; HANSON B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1985;39:1243.

44. MIEKELEY N.; MORTARI S.R.; SCHUBACH A.O. Monitoring of total antimony and its species by ICP-MS and on-line ion chromatography in biological samples from patients treated for leishmaniasis. *Anal Bioanal Chem*. 2002;372:495–502.

45. MOLOKHIA M.M.; SMITH H. The behaviour of antimony in blood. 1969; 222-225.

46. REES P.H.; KAGER P.A.; KEATING M.I.; HOCKMEYER W.T. Renal clearance of pentavalent antimony (sodium stibogluconate), *The Lancet*. 1980; 226-229.
47. VALLADARES J.E.; ALBEROLA J.; ESTEBAN M.; ARBOIX M. disposition of antimony after the administration of N-methylglucamine antimoniate to dogs. *Veterinary Record*. 1996;138:181-183.
48. ROMERO G.A.S.; FLORES E.M.M.; NORONHA E.F., MACÊDO V.O. High frequency of skin reactions in patients with leishmaniasis treated with meglumine antimoniate contaminated with heavy metals. A comparative approach using historical controls. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2003; 98:145-149.
49. OLIVEIRA M.C.; AMORIM R.F.B.; FREITAS R.A.; COSTA A.L.L. Óbito em caso de leishmaniose cutaneomucosa após o uso de antimonial pentavalente. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2005; 38: 258-260.
50. SINGH S.; SIVAKUMAR R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. 2004;10:307-315.
51. ARANA B.; RIZZO N.; DIAZ A. Chemotherapy of cutaneous leishmaniasis: a review. *Med. Microbiol. Immunol*. 2001;190:93-95.
52. CHULAY J.D.; SPENCER H.C.; MUGAMBI M. Eletrocardiographic changes during treatment of leishmaniasis with pentavalent antimony (sodium stibogluconate). *American Journal of Medicine and Hygiene*. 1985;34:702-709.
53. SAMPAIO R.N.R. Tratamento hospitalar da leishmaniose cutâneo mucosa. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 1984.
54. GALLEGO P.J.M.; TORRES A.C.; ALMAGRO M.; DE PUERTA S.; GARRIDO P.L.; MORALS M.G.; ESQUIVIAS J.J. Kalazer y anemia hemolítica autoimmune. A propósito de um caso de evolución fatal por hepatotoxicidade del antimoniato de N'metil glucamina. *Revista Clinica Española*, 1982;164:417-420.

55. CROFT L.S.; SUNDAR S.; FAIRLAMB A.H. Drug resistance in leishmaniasis. *Clinical Microbiology Reviews*. 2006;19(1):111-126.
56. GONTIJO B.; DE CARVALHO M.L.R. Leishmaniose tegumentar americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2003;36(1):71-80.
57. ANDERSEN E.M.; CRUZ-SALDARRIAGA M.; LLANOS-CUENTAS A.; LUZ-CJUNO M.; ECHEVARRIA J.; MIRANDA-VERASTEGUI C.; COLINA O.; BERMAN J.D. Comparison of meglumine antimoniate and pentamidine for peruvian cutaneous leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2005;72(2):133–137.
58. ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Guideline for the testing of chemicals. Developmental Neurotoxicity Study. França. 2007;426.
59. SALEWISKI, E. Faerbemethoden zum Makroskopischen Nachweis von Implantationsstellen am Uterus der Ratte. *Naunyn – Schmiedebergs Archiv fuer Experimentelle Pathologie und Pharmakologie*. 1964, 247,367.
60. SMART J.L.; DA SILVA V.A.; MALHEIROS L.R.; PAUMGARTTEN F.J.R.; MASSEY R.F. Epidermal growth factor advances some aspects of development but retards others in both rats and hamsters. *Journal of Developmental Physiology*. 1989;11:153-158.
61. DA SILVA V.A.; SMART J.L.; FREIRE E.M.; PAUMGARTTEN F.J.R. Neurobehavioural development of the golden hamster. *Neurotoxicology and Teratology*. 1989;11:105-114.
62. PAUMGARTTEN F.J.R.; DE-CARVALHO R.R.; SOUZA C.A.M.; MADI K.; CHAHOUD I. Study of the effects of  $\beta$ -myrcene on rat fertility and general reproductive performance. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 1998;31:955-965.
63. RABELLO-GAY M.N. Mutagênese, teratogênese e carcinogênese: métodos e critérios de avaliação. *Sociedade Brasileira de Genética*. 1991.

64. DALLEGRAVE E.; MANTESE F.D.; OLIVEIRA R.T.; ANDRADE A.J.M.; DALSENTER P.R.; LANGELOH A. Pre-and postnatal toxicity of the commercial glyphosate formulation in wistar rats. *Arch Toxicol.* 2007;81:665-673.
65. CHAHOUD I.; KWASIGROCH T.E. Controlled breeding of laboratory animals. In: NEUBERT D.; MERKER H.J.; KWASIGROCH, T.E. (Editors). *Methods in Prenatal Toxicology.* Georg Thieme Publishers, Stuttgart, 1977;78-91.
66. UNITED STATES. Environmental Protection Agency. EPA/630/R-96/009: Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment, Washington. 1996.
67. ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Retrospective performance assessment of the test guideline 426 on developmental neurotoxicity, series on testing and assessment. França. 2008;89.
68. IEZHITSA I. N.; SPASOV A. A.; BUGAEVA L. I. Effects of bromantan on offspring maturation and development of reflexes. *Neurotoxicology and Teratology.* 2001;23:213-222.
69. DE CASTRO V.L.S.S.; DESTEFANI C.R.; DINIZ C.; POLI P., Evaluation of neurodevelopmental effects on rats exposed prenatally to sulfentrazone. *Neuro Toxicology.* 2007;28:1249–1259.
70. DEIRÓ T.C.B.J.; CARVALHO J.; DO NASCIMENTO E.; MEDEIROS J.M. B.; CAJUHI F.; FERRAZ-PEREIRA K.N.; MANHÃES-DE-CASTRO R. Neonatal exposure to citalopram, a serotonin selective reuptake inhibitor. Programs a delay in the reflex ontogeny in rats. *Arq. Neuropsiquiatr.* 2008; 66(3-B):736-740.
71. BOUET V.; WUBBELS R.J.; DE JONG H.A.A.; GRAMSBERGEN A. Behavioural consequences of hypergravity in developing rats. *Developmental Brain Research.* 2004;153:69–78.

72. BRUSQUE A.M.; MELLO C.F.; BUCHANAN D.N.; TERRACCIANO S.T.; ROCHA M.P.; VARGAS C.R.; WANNMACHER C.M.D.; WAJNER M. Effect of chemically induced propionic acidemia on neurobehavioral development of rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 1999;64(3): 529–534.
73. HAUBNER L.; SULLIVAN J.; ASHMEADE T.; SASTE M.; WIENER D.; CARVER J. The effects of maternal dietary docosahexaenoic acid intake on rat pup myelin and the auditory startle response. *Dev. Neurosci*. 2007; 29:460–467.
74. HOTEZ P.J; MOLYNEUX D.H; FENWICK A.; KUMARESAN J.; SACHS S.E. Control of neglected tropical diseases. *N. Engl. J. Med*. 2007;357: 1018–1027.
75. SANOFI-AVENTIS, abril de 2005. Disponível em: [www.sanofi-aventis.com.br](http://www.sanofi-aventis.com.br). Acessado em: 10 de abr. 2010.
76. SANOFI-AVENTIS, janeiro de 2007. Disponível em: [www.sanofi-aventis.com.br](http://www.sanofi-aventis.com.br). Acessado em: 10 de abr. 2010.
77. MORGAN D.J.; GUIMARAES L.H.; MACHADO P.R.L.; D’OLIVEIRA Jr. A.; ALMEIDA R.P.; LAGO E.L.; FARIA D.R.; TAFURI W.L.; DUTRA W. O.; CARVALHO E.M. Cutaneous leishmaniasis during pregnancy: exuberant lesions and potential fetal complications clinical infectious diseases. 2007; 45:478–482.
78. MUELLER M.; BALASEGARAM M.; KOUMMUKI Y.; RITMEYER K.; SANTANA M.R.; DAVIDSON R. A comparison of liposomal amphotericin B with sodium stibogluconate for the treatment of visceral leishmaniasis in pregnancy in Sudan. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2006;58:811-815.
79. SCHROEDER H.A.; MITCHENER M.; BALASSA J.J.; NASON M. K. A.P. Zirconium, niobium, antimony and fluorine in mice: effects on growth, survival and tissue levels. *Journal of Nutrition*. 1968;95-101.
80. GERBER G.B.; MAES J.; EYKENS B. Transfer of antimony and arsenic to the developing organism. *Arch Toxicol*. 1982;49:159-168.

81. GEBEL T. Arsenic and antimony: comparative approach on mechanistic toxicology. 1997;3(107):131-144.
82. COLOMINA M.T.; ALBINA M.L.; DOMINGO J.L.; CORBELLA J. Influence of maternal stress on the effects of prenatal exposure to methylmercury and arsenic on postnatal development and behavior in mice: a preliminary evaluation. *Physiol. Behav.* 1997;61:455–459.
83. RODRÍGUEZ V.M.; CARRIZALES L.; MENDOZA M.S.; FAJARDO O.R.; GIORDANO M. Effects of sodium arsenite exposure on development and behavior in the rat. 2002;24(6):743-750.
84. PAULUS M.P.; DULAWA S.C.; RALPH R.J.; GEYER M.A. Behavioural organization is independent of locomotor activity in 129 e c57 mouse strains. *Brain Research.* 1999;835:27-36.
85. PALANZA P. Animal models of anxiety and depression: how are females different? *Neuroscience and Biobehaviour.* 2001;25:219–233.
86. BOWMAN R.E.; MACLUSKY N.J.; SARMIENTO Y. Sexually dimorphic effects of prenatal stress on cognition, hormonal responses, and central neurotransmitters. *Endocrinology.* 2004;145:3778–3787.
87. LYNN D.A.; BROWN G.R. The ontogeny of exploratory behavior in male and female adolescent rats (*Rattus norvegicus*). *Dev. Psychobiol.* 2009;51(6):513-20.
88. PALENICEK T.; HLINAK Z.; BUBENÍKOVÁ-VALLSOVÁ V.; NOVÁK T.; HARÁČEK J. Sex differences in the effects of N-N-diethyllysergide (LSD) on behavioural activity and prepulse inhibition. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry.* Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>. Acessado em 6 de mai. 2010.
89. BIRKE L. I. A.; ARCHER J. Some issues and problems in the study of animal exploration. In *exploration in animals and humans*. Wokingham: Van Nostrand Reinhold. 1983;1-21.

90. BERLYNE D.E. Novelty and curiosity as determinants of exploratory behavior. *British Journal of Psychology*. 1950;41:68-80.
91. POON R.; CHU I.; LECAVALIER P.; VALLI V. E.; FOSTER W.; GUPTA S.; THOMAS B. Effects of antimony on rats following 90-day exposure via drinking water. *Food and Chemical Toxicology*. 1998;36(1):21-35.
92. GRIMALDI JR G.; PORROZZI R.; FRIEDRICH K.; TEVA A.; MARCHEVSKY R.S.; VIEIRA F; MIEKELEY N; PAUMGARTTEN F.J. Comparative efficacies of two antimony regimens to treat leishmania braziliensis-induced cutaneous leishmaniasis in rhesus macaques (macaca mulatta). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010;54(1):502-505.
93. SEED J.; CHAPIN R.E.; CLEGG E.D.; DOSTAL L.A.; FOOTE R. H.; HURTT M.E.; KLINEFELTER G.R.; MAKRIS S.L.; PERREAULT S.D.; SCHRADER S.; SEYLER D.; SPRANDO R.; TREINEN K.A.;VEERAMACHANENI D.N.R.; WISE L.D. Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. *Reproductive Toxicology*. 1996;10(3):237-244.
94. AMANN R.P. Detection of alteration in testicular and epididymal function in laboratory animals. *Environmental Health Perspectives*. 1986;70:149-158.
95. AMANN R. P. Use of animal models for detecting specific alterations in reproduction. *Fundam Appl Pharmacol*,1982; 2(82):13-25.