

ALESSANDA FERNANDES LOUZADA HOEGEMANN RAMOS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EMBRIOTÓXICO DO TACROLIMUS  
(FK506) ADMINISTRADO A RATAS WISTAR**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós – Graduação em Saúde; Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Saúde – área de concentração Saúde Brasileira.**

**ORIENTADORA: Prof<sup>a</sup>. Dra. Vera Maria Peters**

**CO-ORIENTADORA: Prof<sup>a</sup>. Dra. Martha de Oliveira Guerra**

**JUIZ DE FORA**

**2007**

Ramos, Alessanda Fernandes Louzada Hoegemann

Avaliação do potencial embriotóxico do Tacrolimus (Fk506) administrado a ratas Wistar / Alessanda Fernandes Louzada Hoegemann Ramos; orientador: Profa. Dra. Vera Maria Peters; co-orientador: Profa. Dra. Martha de Oliveira Guerra. - 2007.  
80 f.

Dissertação (Mestrado em Saúde)-Faculdade de Medicina,  
Universidade  
Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2007.

1. Embriologia - Toxicologia. 2. Pesquisa com embriões - Animal.  
I. Peters, Vera Maria. II. Guerra, Martha de Oliveira. III. Título.

CDU 611-013

ALESSANDA FERNANDES LOUZADA HOEGEMANN RAMOS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EMBRIOTÓXICO DO TACROLIMUS (FK506)  
ADMINISTRADO A RATAS WISTAR**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós – Graduação em Saúde; Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Saúde – área de concentração Saúde Brasileira.

Aprovada em 22 de agosto de 2007.

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Vera Maria Peters (Orientadora)**

Universidade Federal de Juiz de Fora

---

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Hélydy Sanders Pinheiro**

Universidade Federal de Juiz de Fora

---

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Tânia Toledo de Oliveira**

Universidade Federal de Viçosa

**JUIZ DE FORA**

**2007**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a DEUS por tudo que me proporciona.

Ao meu esposo e ao meu filho, que é a razão da minha vida, meu profundo reconhecimento pela grandeza com que souberam compreender e incentivar a minha caminhada.

A minha mãe e irmã por seu amor e apoio incondicional.

À minha Orientadora Dra. Vera Maria Peters, pela paciência, dedicação, incentivo, apoio durante o desenvolvimento das atividades e pelos ensinamentos durante a orientação.

À Dra. Martha de Oliveira Guerra, por seu carinho, amizade e por tudo que me ensinou.

Aos técnicos, Rosemar Rodrigues de Azevedo, Evelise Rocha de Souza e Paulo Sérgio do Carmo pelo apoio e atenção durante o desenvolvimento das atividades práticas.

A Nathália Borges pelos ensinamentos durante o desenvolvimento das atividades práticas.

A Lorena S. Ribeiro e Jhennifer K. Rodrigues pelo companheirismo, amizade, dedicação e ajuda durante todo o período de realização das atividades.

A Luciana Borges pela atenção e amizade a mim dispensada e pela ajuda na redação dos artigos e da dissertação.

A Rosana Oliveira, Lúcia Piúma, Eduardo Fernandes e Rafael Pinto pela amizade, paciência, pela força e encorajamento nas horas mais difíceis do Mestrado.

A todos os estagiários e pesquisadores do Centro de Biologia da Reprodução.

A todos os funcionários do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução, pelo cuidado com os animais de experimentação e pela atenção que me dispensaram.

A Professora Lúcia Cangussu pelo apoio e incentivo nas tardes de estudo.

A FAPEMIG – Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais e pela Rede Mineira de Ensaio Toxicológicos e Farmacológicos de Produtos Terapêuticos pelo apoio financeiro.

À Coordenação do Mestrado em Saúde Brasileira.

A todos, muito obrigada.

## RESUMO

O tacrolimus é um antibiótico macrolídeo com ação imunossupressora, atuando como inibidor de calcineurina, que vem sendo utilizado como droga base na maioria dos transplantes para evitar rejeição. Com o êxito dos transplantes, decorrente principalmente do uso de imunossupressores, houve uma melhora na qualidade de vida das pacientes transplantadas. Esta melhora levou ao aumento do número de gestações, mesmo sob o uso contínuo de imunossupressores. Sabe-se que os imunossupressores atravessam a placenta podendo levar a alterações no desenvolvimento do embrião. Segundo a literatura, foram observados desvios da normalidade, como perda de peso, em recém nascidos de mães que utilizavam o tacrolimus. Entretanto, pouco se sabe sobre a sua atuação no período de pré-implantação do blastocisto, sendo o objetivo deste trabalho verificar se o tacrolimus interfere no desenvolvimento do embrião de rata, durante seu trânsito tubário e na fase de implantação do blastocisto. Ratas Wistar prenhes foram distribuídas aleatoriamente nos grupos controles C1 e C2 e tratados T1, T2, T3 e T4, T5 e T6. Controle 1 e Tratados 1, 2 e 3 receberam água destilada e 1, 2 e 4 mg/kg/dia de Tacrolimus respectivamente por via intragástrica do primeiro ao quinto dia de prenhez (período de trânsito tubário) e os grupos Controle 2 e Tratados 4, 5 e 6 receberam água destilada e 1, 2 e 4 mg/kg/dia de tacrolimus, respectivamente, por via intragástrica, do quinto ao sétimo dia (período de implantação). O acompanhamento de sinais clínicos maternos possibilitou a análise de efeitos tóxicos sobre a mãe durante o período de gestação. No 15<sup>o</sup> dia, foi coletado sangue para avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos, em seguida os animais foram eutanasiados. Ovários, fígado e rim foram pesados e os corpos lúteos contados. Foram identificados fetos vivos, reabsorções e fetos mortos. Fetos e placentas foram pesados. Não foram encontrados indícios clínicos de toxicidade materna. No período de trânsito tubário não foram observadas alterações significativas no peso corporal, consumo de ração e parâmetros hematológicos das mães. Na análise bioquímica, o grupo da dose de 4 mg/kg/dia apresentou aumento na concentração de colesterol, de TGO e de uréia. No grupo com dose de 2mg/kg/dia ocorreu redução de creatinina e no grupo T1 houve uma redução de TGO. No período de implantação do blastocisto, não foram observadas variações no peso corporal entre os grupos analisados. Foi observada uma diminuição no consumo de ração, durante o período de tratamento, que foi restabelecido com o término deste, apresentando um aumento gradativo do consumo até o final do experimento. O tacrolimus na concentração de 4mg/Kg/dia apresentou consumo médio superior aos demais grupos. Os parâmetros hematológicos não apresentaram alterações significativas. Os parâmetros bioquímicos não apresentaram alterações relevantes entre os grupos experimentais, exceto os referentes à TGO, que apresentou uma diminuição no grupo T6. Nos estudos realizados no período de trânsito tubário e no de implantação, observando-se o peso corporal materno corrigido, os pesos de fígado e rins maternos, peso de ovários, número de corpos lúteos, fetos vivos e mortos, reabsorções, peso de ninhada e perdas pré e pós-implantação, não foram encontradas diferenças significativas. Ocorreu aumento no peso placentário dos animais tratados com tacrolimus na concentração de 4mg/Kg/dia e no grupo tratado com a concentração de 1mg/Kg/dia, diminuição do número de implantes. Os fetos em ambos os experimentos não apresentaram malformações externas. Concluiu-se que no modelo experimental utilizado não foi evidenciado potencial embriotóxico do tacrolimus na fase de trânsito tubário e na implantação, quando administrado a ratas.

**Palavras-chave:** Tacrolimus, embriotoxicidade, rato; imunossupressor, gravidez, implantação.

## ABSTRACT

Tacrolimus is a macrolide antibiotic with immunosuppressive action, acting as a calcineurin inhibitor, that has been used as a standard drug avoiding rejection of most transplants. With the success of transplantations, which occurred mainly due to the use of immunosuppressive drugs, there was an improvement in life quality of patients. This fact, led to an increase in the number of gestations, even under continuous use of immunosuppressants. It is known that these drugs cross the placenta, leading to changes in embryo development. Body weight loss in newborns from mothers that used tacrolimus during gestation is described in literature. However, little is known about its action on blastocyst preimplantation period, being the aim of this work to assess if tacrolimus interferes with embryo development during tubaric transit and blastocyst implantation periods. Pregnant Wistar rats were randomly distributed into control C1 and C2 and treated T1, T2, T3, T4, T5 and T6. Control 1 and Treated 1, 2 and 3 received distilled water and 1, 2 and 4 mg/kg/day of tacrolimus, respectively, via oral gavage from first to fifth pregnancy day (tubaric transit period) and groups Control 2 and Treated 4, 5 and 6 received distilled water and 1, 2 and 4 mg/kg/day of tacrolimus respectively, via oral gavage from fifth to seventh day (implantation period). The clinical signs of maternal toxicity were analyzed. On 15<sup>th</sup> day, blood was collected for biochemical and hematological tests assessment, after that animals were killed. Ovaries, liver and kidneys were weighed and the corpora lutea were counted. Resorptions, live and dead fetuses were identified. Fetuses and placenta were weighed. Clinical signs of maternal toxicity were not found. During the period of tubaric transit there were no significant alteration in maternal body weight, food intake and hematological parameters. In biochemical analysis, the group treated with 4 mg/kg/day presented an increase in cholesterol, TGO and urea. In the group treated with 2 mg/kg/day there was creatinine reduction and group T1 (1mg/kg/day) showed reduction in TGO. In the period of blastocyst implantation it was not observed changes in body weight among groups. There was a decrease in food intake, during the treatment period which was recovered after the drug administration, showing a gradative increase at food intake until the end of the experiment. An increase in food intake in the group treated with tacrolimus in the concentration of 4mg/Kg/day was shown. There were no significant alterations in hematological parameters. In biochemical analysis no alterations were found, except in the group T6 (4mg/kg/day) that presented a decrease. In the both experiments, during the period of blastocyst implantation and the tubaric transit, there were no significant alterations in maternal body, liver, kidney and ovaries weights. Were not observed significant alterations in the number of corpora lutea, live and dead fetuses, resorptions, fetuses weigh and lost in pre and pos implantation. In the groups treated with tacrolimus on the concentrations of 4mg/kg/day and 1mg/kg/day were observed a decrease of the implants number. The administration of Tacrolimus to pregnant rats during the tubal transit and implantation periods does not seem to generate any toxic effect on them.

**Keywords:** Tacrolimus; Embryo; Toxicity; Rat; Immunosuppressor; Pregnancy; Implantation.

## LISTA DE FIGURAS E QUADROS

### FIGURAS

<b>Fig. 1</b>	Mecanismo de rejeição hiperaguda do enxerto.	20
<b>Fig. 2</b>	Mecanismo de rejeição aguda do enxerto	21
<b>Fig. 3</b>	Mecanismo de rejeição crônica do enxerto.	22
<b>Fig. 4</b>	Estrutura química do tacrolimus.	32
<b>Fig. 5</b>	Mecanismo de ação da ciclosporina (CSA) e do tacrolimus (FK506).	33
<b>Fig. 6</b>	Peso corporal de ratas tratadas com água destilada (C1) e Tacrolimus 1,0 mg/kg/dia (T1), 2,0mg/kg/dia (T2) e 4,0mg/kg/dia (T3), do 1 <sup>o</sup> ao 5 <sup>o</sup> dia de prenhez	48
<b>Fig. 7</b>	Consumo de ração de ratas tratadas com água destilada (C1) e Tacrolimus 1,0 mg/kg/dia (T1), 2,0mg/kg/dia (T2) e 4,0mg/kg/dia (T3), do 1 <sup>o</sup> ao 5 <sup>o</sup> dia de prenhez.	49
<b>Fig. 8</b>	Peso corporal de ratas tratadas com água destilada (C2) e Tacrolimus 1,0 mg/kg (T4), 2,0mg/kg (T5) e 4,0mg/kg/dia (T6), do 5 <sup>o</sup> ao 7 <sup>o</sup> dia de prenhez.	53
<b>Fig. 9</b>	Consumo de ração de ratas tratadas com água destilada e Tacrolimus do 5 <sup>o</sup> ao 7 <sup>o</sup> dia de prenhez.	54

### QUADRO

<b>Quadro 1</b>	Locais de ação de alguns imunossupressores na ativação dos linfócitos T.	25
-----------------	--	----

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Parâmetros hematológicos de ratas tratadas com água destilada (C1) e Tacrolimus 1,0 mg/kg (T1), 2,0mg/kg (T2) e 4,0mg/kg/dia (T3), do 1 <sup>o</sup> ao 5 <sup>o</sup> dia de prenhez, e no dia da eutanásia.	50
<b>Tabela 2</b>	Parâmetros bioquímicos de ratas tratadas com água destilada (C1) e Tacrolimus 1,0 mg/kg/dia (T1), 2,0mg/kg/dia (T2) e 4,0mg/kg/dia (T3), do 1 <sup>o</sup> ao 5 <sup>o</sup> dia de prenhez, e no dia de eutanásia.	51
<b>Tabela 3</b>	Peso corporal corrigido e de órgãos maternos em ratas Controles (C1) e tratadas com Tacrolimus 1,0 mg/kg/dia (T1), 2,0mg/kg/dia (T2) e 4,0mg/kg/dia (T3), do 1 <sup>o</sup> ao 5 <sup>o</sup> dia de prenhez.	52
<b>Tabela 4</b>	Parâmetros hematológicos de ratas tratadas com água destilada (C2) e Tacrolimus 1,0 mg/kg (T4), 2,0mg/kg (T5) e 4,0mg/kg/dia (T6), do 5 <sup>o</sup> ao 7 <sup>o</sup> dia de prenhez.	55
<b>Tabela 5</b>	Parâmetros bioquímicos de ratas tratadas com água destilada (C2) e Tacrolimus 1,0 mg/kg/dia (T4), 2,0mg/kg/dia (T5) e 4,0mg/kg/dia (T6), do 5 <sup>o</sup> ao 7 <sup>o</sup> dia de prenhez, e no dia de eutanásia.	56
<b>Tabela 6</b>	Peso de fígado, rins e ovários de ratas tratadas com água destilada (C2) e Tacrolimus 1,0 mg/kg (T4), 2,0mg/kg (T5) e 4,0mg/kg/dia (T6), do 5 <sup>o</sup> ao 7 <sup>o</sup> dia de prenhez.	57
<b>Tabela 7</b>	Peso de ovários, número de corpos lúteos, fetos vivos e mortos em ratas Controles (C1) e tratadas com Tacrolimus 1,0 mg/kg/dia (T1), 2,0mg/kg/dia (T2) e 4,0mg/kg/dia (T3), do 1 <sup>o</sup> ao 5 <sup>o</sup> dia de	58

prenhez.

- |                 |   |    |
|-----------------|---|----|
| <b>Tabela 8</b> | Reabsorções, peso de ninhada e placenta, número de implantes, proporção de implantação e de perdas pré-implantação em ratas Controles (C1) e tratadas com Tacrolimus 1,0 mg/kg/dia (T1), 2,0mg/kg/dia (T2) e 4,0mg/kg/dia (T3), do 1 <sup>o</sup> ao 5 <sup>o</sup> dia de prenhez.                                     | 59 |
| <b>Tabela 9</b> | Peso de ovários, número de corpos lúteos, fetos vivos e mortos, reabsorções, peso de ninhada e placenta, número de implantes e de perdas pós-implantação em ratas Controle (C2) e Tratadas com Tacrolimus 1,0mg/kg/dia (T4), 2,0mg/kg/dia (T5) e 4,0mg/kg/dia (T6), do 5 <sup>o</sup> ao 7 <sup>o</sup> dia de prenhez. | 60 |

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E QUADROS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.1 HIPÓTESE .....	15
1.2 OBJETIVOS .....	15
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
2.1 BREVE HISTÓRICO SOBRE O TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS .....	16
2.2 RESPOSTA IMUNE E REJEIÇÃO NO TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS .....	18
2.2.1 Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) e Antígenos leucocitários humanos (HLA) .....	18
2.2.2 O papel dos linfócitos T .....	19
2.2.3 Manifestações clínicas da rejeição .....	20
2.3 AGENTES IMUNOSSUPRESSORES.....	23
2.3.1 Corticosteróides .....	26
2.3.2 Muromonab – CD3 .....	27
2.3.3 Azatioprina .....	27
2.3.4. Mofetil Micofenolato.....	28
2.3.5. Daclizumab, Basilix .....	28
2.3.6. Sirolimus.....	29
2.3.7. Ciclosporina.....	30
2.3.8 Tacrolimus.....	32
2.4 ASPECTOS GERAIS DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO .....	40
2.4.1 Alterações do ambiente e suas conseqüências para o desenvolvimento embrionário. ....	41
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	43
3.1 MODELO EXPERIMENTAL .....	43
3.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....	43

3.3 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE MATERNA.....	46
3.4 AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO.....	47
3.5 PROCESSAMENTO ESTATÍSTICO .....	47
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>49</b>
4.1 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE MATERNA.....	49
4.2 AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO.....	58
<b>5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO</b> .....	<b>62</b>
5.1 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO TACROLIMUS SOBRE O ORGANISMO MATERNO .....	62
5.2 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO TACROLIMUS SOBRE O EMBRIÃO.....	65
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>68</b>

# 1. INTRODUÇÃO

A capacidade do organismo de reproduzir-se é essencial à sobrevivência da espécie, mas a reprodução é um processo extremamente vulnerável aos fatores do meio externo (MICHAL *et al.*, 1993) e interno (CALDEYRO - BARCIA, 1981).

O desenvolvimento do conceito ocorre em microambientes localizados na tuba e no útero. Fatores do meio externo e interno, capazes de alterar estes ambientes, podem provocar lesões, que dependendo da gravidade causam malformações ou até mesmo a morte do conceito.

Distúrbios relacionados ao meio ambiente causados por gases poluentes e radiações, ou distúrbios do ambiente materno como os causados por enfermidades diversas, pela ingestão de alimentos contaminados, drogas de abusos ou fármacos, são causas conhecidas de malformações fetais (LEMÔNICA, 1996). A ingestão de fármacos que atravessam a placenta é um dos fatores mais comuns de agressão ao conceito.

Nos casos de transplantes renais são usadas drogas imunossupressoras com o objetivo de impedir a rejeição do órgão transplantado. O uso de imunossupressores deve ser contínuo, para que se previna a rejeição do enxerto, o que leva à necessidade de que seja feito um aconselhamento às mulheres transplantadas, em idade fértil, quanto a possíveis complicações na gravidez, provocadas, em parte, pelos efeitos colaterais das drogas imunossupressoras (LESSAN-PEZESHKI, 2002).

Entre os imunossupressores mais utilizados encontra-se o tacrolimus um macrolídeo de ação imunossupressora potente (GOTO *et al*, 1987; HOOKS,1994; PARSON; NOLAN; WYVRATT, 1993), que foi introduzido na terapêutica imunossupressora na década de 80, revolucionando o transplante de órgãos e diminuindo a rejeição (GARCIA *et al*, 2004).

O uso clínico do tacrolimus é crescente, sendo considerada, atualmente, a droga base em mais de 80% dos transplantes hepáticos e 30% dos transplantes renais (GARCIA *et al*, 2004).

Mulheres que apresentam insuficiência renal crônica tendem a apresentar infertilidade relativa que se restabelece com o transplante renal, melhorando a função endócrina, restabelecendo o ciclo menstrual e a fertilidade. Com o êxito do transplante renal e com a conseqüente melhora na qualidade de vida de portadores de doença renal tem-se observado aumento do número de gestações em pacientes transplantadas (SOUZA, 2002).

O início da gestação, em geral, não é perceptível pela mulher, sendo detectado apenas quando nota o atraso em sua menstruação. Nesse período o blastocisto já está implantado e o embrião já ultrapassou toda uma etapa inicial de desenvolvimento. Durante essa fase inicial do desenvolvimento, o embrião costuma responder às agressões seguindo a lei do tudo ou nada: morre ou recupera-se, mas existe a possibilidade de sobreviver com alterações cromossômicas que podem levar a malformações (BROCAS *et al*, 1997; MANSON; KANG, 1994). Assim a exposição

materna ao imunossupressor, em fase precoce da gestação pode ter conseqüências indesejáveis para o embrião.

Na literatura consultada não foram encontradas referências sobre avaliações do efeito do tacrolimus no início da gestação, portanto, nesse projeto pretendeu-se avaliar, experimentalmente, o efeito da exposição de ratas ao tacrolimus, no período inicial da prenhez, de modo a contribuir para a avaliação do risco reprodutivo do uso do fármaco.

## **1.1 HIPÓTESE**

A exposição de ratas, ao tacrolimus, no início da prenhez interfere com o desenvolvimento embrionário.

## **1.2 OBJETIVOS**

Verificar se o Tacrolimus administrado a ratas gestantes interfere:

- No desenvolvimento do embrião durante o trânsito tubário;
- Na fase de implantação do blastocisto.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 BREVE HISTÓRICO SOBRE O TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS**

Segundo Druml (2002), Emerich Ullman foi responsável pela primeira tentativa de transplante, mas não obteve êxito. Platt e Rubstein (1997), em sua revisão, descrevem que Floresco, Carrel e Guthrie conseguiram êxito na técnica com aloenxertos renais, sendo que o melhor resultado foi um transplante renal ortotópico, que funcionou por cinco dias. Em 1906, Carrel e Guthrie transplantaram os dois rins de um cão para outro, o aloenxerto funcionou por nove dias. Em 1907, Carrel executou uma série de transplantes renais (aloenxertos) em gatos; um dos receptores sobreviveu por trinta e um dias, os demais sobreviveram por apenas catorze dias ou menos. Contudo, em 1908, Carrel realizou um aloenxerto renal que manteve a vida do animal por mais de oito meses.

Os experimentos de Floresco, Carrel e Guthrie foram muito importantes, pois representaram o marco inicial da cirurgia vascular, demonstrando pela primeira vez que um rim removido de seu ambiente natural e reimplantado cirurgicamente poderia funcionar, mesmo que temporariamente (PLATT; RUBSTEIN, 1997). Estes experimentos foram analisados como a primeira demonstração de dois princípios fundamentais do transplante de tecidos e órgãos íntegros:

(1) que auto-enxertos são quase sempre bem sucedidos, ao passo que aloenxertos entre indivíduos aleatórios de uma mesma raça como doadores e receptores, são quase sempre rejeitados;

(2) essa rejeição se desenvolve mais rapidamente que as respostas imunes convencionais (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

Na década de 60, foram realizados os primeiros transplantes com doadores não-aparentados, devido à utilização da azatioprina, um fármaco imunossupressor capaz de minimizar os efeitos do transplante (FURMAN *et al.*,1999). Já nos anos 80, a sobrevida dos transplantados teve um aumento substancial devido ao aparecimento da ciclosporina (ARMENTI, 2004).

Ao longo dos últimos anos, houve avanço no êxito de transplantes renais, com aumento significativo na sobrevida do enxerto e do paciente a curto e em longo prazo. Vários fatores contribuíram para este resultado, entre eles, o aprimoramento da técnica cirúrgica, avanço nas técnicas de exames imunológicos para seleção de doador, conhecimento mais detalhado do mecanismo de rejeição através da biologia molecular, descoberta de potentes agentes antimicrobianos utilizados nos tratamentos das infecções e o aparecimento de novas e poderosas drogas imunossupressoras.

O marco inicial do progresso no resultado dos transplantes se deu na década de 80, com a liberação do uso de ciclosporina (ARMENTI, 2004). A partir deste evento, uma série de novos fármacos, imunossupressores vêm sendo pesquisados, alguns já em uso clínico e outros ainda em fase de estudo experimental e pré-clínica. Devido ao número de fármacos disponíveis, a imunossupressão atual é individualizada para cada tipo de transplante, baseando-se nas variáveis do receptor e do doador de órgãos.

## **2.2 RESPOSTA IMUNE E REJEIÇÃO NO TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS**

### **2.2.1 Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) e Antígenos leucocitários humanos (HLA)**

O sucesso de qualquer transplante está na capacidade de controlar a resposta imune, permitindo a adaptação do transplante e evitando a sua rejeição. Os principais genes responsáveis pelo reconhecimento de antígenos externos, o complexo principal de histocompatibilidade (MHC), estão localizados no braço curto do cromossoma 6. Nos seres humanos, estes genes codificam várias proteínas da superfície da membrana celular. Estes aloantígenos são conhecidos como antígenos leucocitários humanos (HLA – Human leukocyte antigens) e o seu elevado polimorfismo permite ao sistema imunológico reconhecer antígenos próprios e não-próprios. Os genes MHC podem ser divididos em duas classes: o MHC I e MHC II (KINDT, GOLDSBY, OSBORNE, 2006).

O MHC da classe I (HLA-A, HLA-B e HLA-C) encontra-se em praticamente todas as superfícies celulares. Esta classe de MHC reconhece antígenos protéicos externos, incluindo tecidos transplantados e são reconhecidos por linfócitos T com especificidade antigênica. As moléculas de classe I são reconhecidas por linfócitos T citotóxicos ou CD8+ (KINDT, GOLDSBY, OSBORNE, 2006).

Por outro lado, o MHC de classe II (HLA-DR, HLA-DP e HLA-DQ) encontra-se apenas em células que apresentam antígenos (APC – antigen-presenting cells) como os linfócitos B, macrófagos e células dendríticas. Acredita-se que o MHC de classe II desempenha o papel predominante na resposta imunológica inicial a antígenos de tecidos transplantados. Ao entrarem em contato com um antígeno não-próprio, os HLA de classe II apresentam este antígeno aos linfócitos Th (helper ou CD4+) que, por sua vez, sofrem uma expansão clonal através da produção de citocinas reguladoras (KINDT, GOLDSBY, OSBORNE, 2006).

### **2.2.2 O papel dos linfócitos T**

O processo de reconhecimento de antígenos transplantados é conhecido como alorreconhecimento e poderá ocorrer por duas vias distintas. A via direta envolve receptores nos linfócitos T do hospedeiro que reconhecem antígenos ligados nas células do órgão transplantado. A via indireta requer uma célula apresentadora de antígeno (APC) que processa o antígeno e o apresenta às células CD4+. A interação entre os linfócitos T e a APC é um processo complexo que resulta na ativação de vias de sinalização celular. Porém, a apresentação do antígeno por si só não é suficiente para ativar os linfócitos T. Um segundo sinal, independente do antígeno, é necessário e poderá ser dado através de várias moléculas acessórias como a B7 (molécula co-estimuladora), moléculas de adesão intercelular (ICAMs) ou o ligando ao CD28 (KINDT, GOLDSBY, OSBORNE, 2006).

Uma vez feito o reconhecimento, ocorre uma importante cascata de eventos ao nível celular. A proteína quinase C é uma enzima responsável pela fosforilação de várias proteínas, resultando na liberação de cálcio intracelular ionizado. Este cálcio intracelular vai ligar-se a uma proteína reguladora dependente de cálcio, a calmodulina, formando um complexo que irá ativar outras fosfatases, em particular a calcineurina. Esta proteína desempenha um papel importante na ativação da transcrição do gene da Interleucina 2 e vai desfosforilar o fator nuclear de linfócitos T ativados (NFAT- nuclear factor of activated T cells). O NFAT desfosforilado migra do citoplasma para o núcleo e adere a locais promotores, induzindo a produção de citocinas. Estas citocinas ativam outros linfócitos T, resultando na destruição do órgão transplantado. Isto resume o processo de rejeição (KINDT, GOLDSBY, OSBORNE, 2006).

Após a sua estimulação, os linfócitos Th (CD4+) produzem uma citocina importante, a interleucina-2 (IL-2), que funciona não só como sinalizador de outros linfócitos T helper e citotóxicos (CD8+), como também vai promover a expansão clonal de linfócitos T, conduzindo a resposta imune. Outras citocinas como o interferon – gama, também são produzidas (KINDT, GOLDSBY, OSBORNE, 2006).

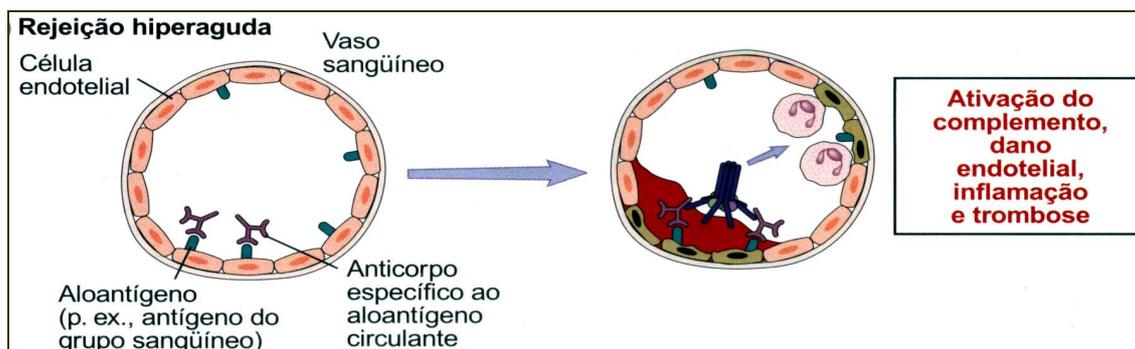
### **2.2.3 Manifestações clínicas da rejeição**

A rejeição de um enxerto depende do reconhecimento do mesmo como estranho pelo organismo do indivíduo receptor, ativando tanto a resposta imune humoral como a celular (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

Podem ocorrer três tipos principais de rejeição: hiperaguda, aguda e crônica. Independentemente do tipo de rejeição, o que ocorre é a disfunção do enxerto levando a quadros de febre, hipertensão, edema ou aumento súbito de peso, mudança no ritmo cardíaco, falta de ar, dor e sensibilidade no local do transplante. (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

### **Rejeição hiperaguda**

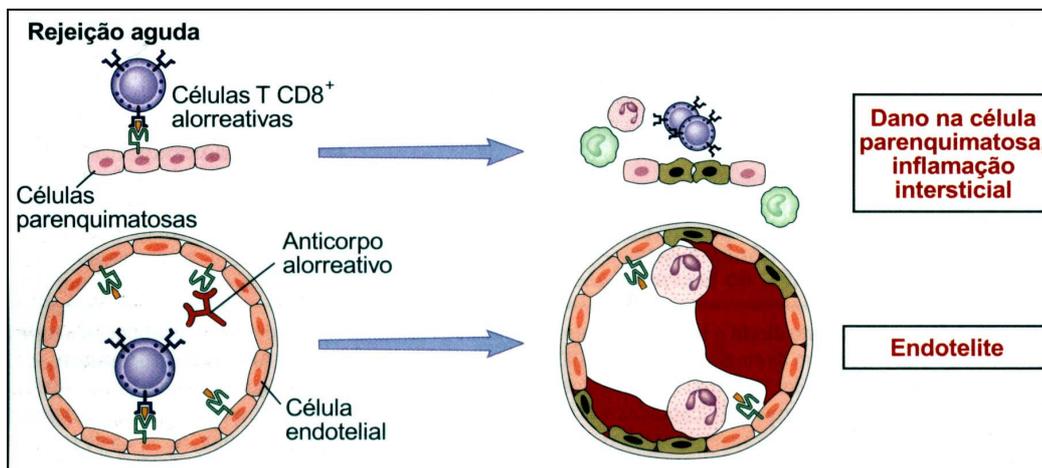
Ocorrendo minutos ou dias após o transplante, a rejeição hiperaguda deve-se à reação dos anticorpos IgG contra a classe I do HLA no órgão transplantado. A função do órgão perde-se como resultado da deposição de anticorpos, ativação do complemento e destruição vascular. Os transplantes renais são muito susceptíveis à rejeição hiperaguda. Atualmente, este tipo de rejeição pode ser evitada detectando-se o anticorpo com reação cruzada antes do transplante. (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).



**Fig. 1.** Mecanismo de rejeição hiperaguda do enxerto. Nas rejeições celulares hiperagudas, os anticorpos formados anteriormente, reagem com os aloantígenos no endotélio vascular do enxerto, ativam o complemento e desencadeiam uma trombose intravascular e necrose da parede do vaso. Fonte: Abbas ; Lichtman (2003).

## Rejeição aguda

A rejeição aguda é a mais comum, ocorrendo freqüentemente nos primeiros 6 meses após o transplante. Após seis meses, o corpo adapta-se ao novo órgão e a rejeição aguda é menos provável. Este tipo de rejeição é mediada por linfócitos T, que infiltram o enxerto, sofrem expansão clonal e causam destruição de tecidos. As drogas imunossupressoras são muito eficazes na prevenção deste tipo de rejeição. (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

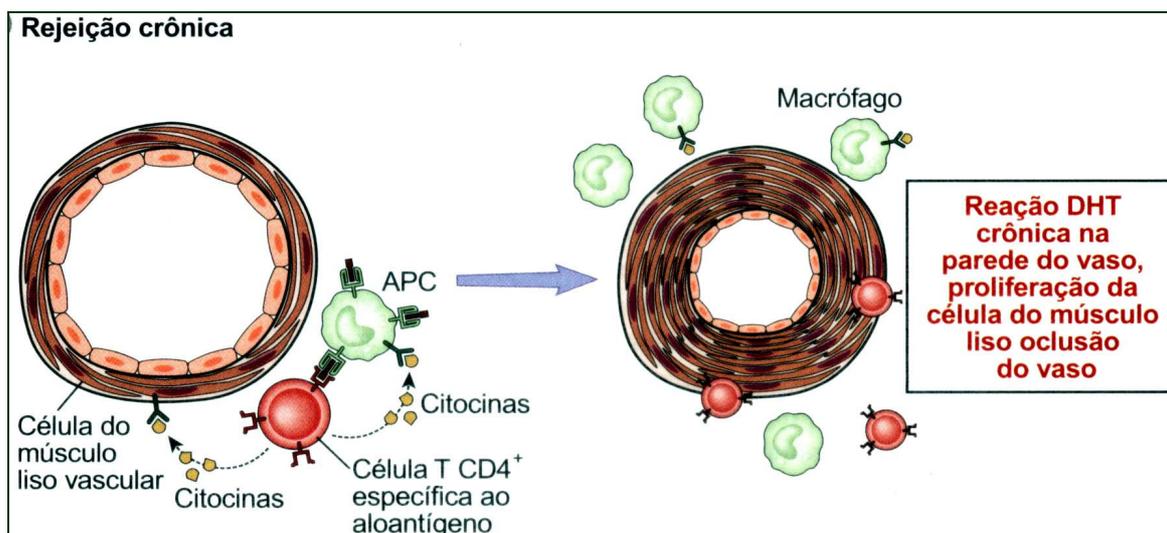


**Fig. 2.** Mecanismo de rejeição aguda do enxerto. Neste tipo de rejeição, os linfócitos T CD8<sup>+</sup> reativos com o os aloantígenos das células endoteliais e parenquimatosas do enxerto causam dano a esses tipos celulares. Os anticorpos alorreativos também podem contribuir para a lesão vascular. Fonte: Abbas ; Lichtman (2003).

## Rejeição crônica

Rejeição crônica é o termo usado quando a função do enxerto se deteriora lentamente, existindo evidências histológicas de hipertrofia e fibrose. Pode ocorrer em todos os tipos de transplante de órgãos. (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

Em todos os órgãos a fisiopatologia é semelhante: hipertrofia progressiva das artérias pequeno-médias que acaba por levar a fibrose intersticial, atrofia e eventual falha no transplante. Apesar de a rejeição crônica ocorrer mais tarde no período pós-transplante, pode desenvolver-se seis a 12 meses após o transplante. (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).



**Fig. 3.** Mecanismo de rejeição crônica do enxerto. Na rejeição crônica com arteriosclerose do enxerto, as células T reativas com os aloantígenos do enxerto podem produzir citocinas que induzem a proliferação das células endoteliais e as células do músculo liso, levando à oclusão luminal. Fonte: Abbas; Lichtman, 2003.

## 2.3 AGENTES IMUNOSSUPRESSORES

O transplante de órgãos envolve cinco princípios fundamentais que contribuem para a minimização da rejeição ao tecido transplantado.

Em primeiro lugar a preparação adequada dos pacientes e a seleção do melhor doador HLA (antígenos do complexo principal de histocompatibilidade no humano) e **ABO** compatível à disposição para doação do órgão (JANEWAY; WALPORT; SHLOMCHIK, 2002).

Em segundo lugar, é usada uma abordagem multisequencial da terapia farmacológica imunossupressora. Vários agentes são utilizados ao mesmo tempo, cada um voltado para um diferente alvo molecular da resposta ao aloenxerto (Quadro 1) (HONG; KAHAN, 2000).

O terceiro deles é assegurar a implantação imediata do enxerto e/ou tratar a rejeição já estabelecida com imunossupressão mais intensa do que a utilizada em longo prazo. Sendo assim, são utilizados protocolos de indução intensiva e manutenção com doses mais baixas.

O princípio seguinte trata da investigação de cada episódio de disfunção do transplante, incluindo avaliação para rejeição, efeitos tóxicos de fármacos e infecção.

O último princípio implica na redução ou interrupção do uso do agente terapêutico quando seus efeitos tóxicos forem maiores que seu benefício.

Os imunossupressores são agentes que suprimem o sistema imune e por isso desempenham um importante papel na manutenção de enxertos de órgãos e tecidos. As principais classes de fármacos usados hoje são: os glicocorticóides, os inibidores da calcineurina e os agentes antiproliferativos/antimetabólicos. Os resultados clínicos obtidos por estes fármacos têm sido bastante significativos no tratamento da rejeição imune aguda de órgãos transplantados. Entretanto, os imunossupressores devem ser usados por toda a vida e acabam suprimindo

inespecificamente todo o sistema imune, expondo os pacientes a riscos maiores de infecções e câncer (KRENSKY; STROM; BLUESTONE, 2003).

No Quadro 1, destacam-se os principais imunossupressores utilizados na terapia de prevenção e/ou resgate da rejeição e seus respectivos mecanismos de ação:

### Quadro 1

Locais de ação de alguns imunossupressores na ativação dos linfócitos T.

<b>FÁRMACO</b>	<b>LOCAL DE AÇÃO</b>
Glicocorticóide	Elementos de resposta aos glicocorticóides no DNA (regulação da transcrição dos genes)
Muromonab-CD3	Complexo receptor das células T (bloqueio do reconhecimento dos antígenos)
Azatioprina	Ácido desoxirribonucléico (incorporação de Nucleotídeos falsos)
Mofetil micofenolato	Monofosfato de iosina desidrogenase (inibição da atividade)
Daclizumab, basiliximab	Receptor da Interleucina-2 (bloqueio da ativação das Células T mediada pela Interleucina-2)
Sirolimus	Cinase protéica envolvida na progressão do ciclo Celular (mTOR) (inibição da atividade)
Ciclosporina	Calcineurina (inibição da atividade da fosfatase)
Tacrolimus	Calcineurina (inibição da atividade da fosfatase)

Fonte: KRENSKY; STROM; BLUESTONE (2003).

#### 2.3.1 Corticosteróides

Os corticosteróides são agentes antiinflamatórios e têm efeitos a vários níveis da resposta imunológica. Usados desde o início dos anos 60, acredita-se que bloqueiam a produção de interleucinas 1, 2 e 6 pelas células apresentadoras de antígenos. Estas drogas são normalmente dadas aos pacientes de transplantes

juntamente com um inibidor mitótico, como por exemplo, a azatioprina, para prevenir a rejeição aguda. Os efeitos adversos dos corticosteróides incluem a hipertensão, hiperlipidemia, doença da úlcera, diabetes, obesidade, catarata, osteoporose e susceptibilidade a infecções. À maioria dos pacientes de transplantes são administradas doses baixas de corticosteróide na duração de vida do transplante (TAYLOR, WATSON, BRADLEY, 2005).

### **2.3.2 Muromonab – CD3**

Anticorpo monoclonal anti-CD3 que exerce efeitos imunossupressivos induzindo a diminuição periférica de células T e modulação do complexo receptor de células T (CD3/Ti). A imunoglobulina G purificada bioquimicamente é obtida através da fusão de células do mieloma de ratos com linfócitos oriundos de animais imunizados para produzir hibridomas que secretam anticorpos específicos para antígenos T3 (CD3) de linfócitos T de humanos. É frequentemente usado como um agente imunossupressor em transplantes. (TAYLOR, WATSON, BRADLEY, 2005).

### **2.3.3 Azatioprina**

É um potente inibidor mitótico sendo normalmente administrada imediatamente antes e depois do transplante, diminuindo a proliferação dos linfócitos T em resposta aos aloantígenos do transplante. A azatioprina atua na célula durante a fase S do ciclo celular. É convertida em 6-mercaptopurina dentro das células inibindo a produção de adenosina monofosfato (AMP) e guanina monofosfato (GMP), atrasando a proliferação celular (TAYLOR, WATSON, BRADLEY, 2005).

#### **2.3.4. Micofenolato Mofetil**

O micofenolato mofetil (MMF) é uma pró-droga éster do imunossupressor ácido micofenólico (MPA), que age como um inibidor potente e reversível da inosina monofosfato desidrogenase (IMPDH), enzima chave na síntese de purinas de novo dos linfócitos T e B em proliferação. O MPA age como um inibidor específico para os linfócitos humanos cuja proliferação é interrompida na fase S do ciclo celular, já que outros tipos celulares apresentam vias alternativas para a síntese de purinas e não bloqueadas pelo MPA (TÖNSHOFF, 1999; TAYLOR, WATSON, BRADLEY, 2005).

#### **2.3.5. Daclizumab, Basiliximab**

São anticorpos monoclonais anti-receptores de interleucina 2 (IL-2R), ou seja, que bloqueiam a fixação da interleucina-2 no receptor do linfócito ativado, impedindo sua proliferação. Portanto, atuam em sinergismo com as drogas imunossupressoras inibidoras da calcineurina (VINCENTI *et al*, 1998; TAYLOR, WATSON, BRADLEY, 2005).

Estudos multicêntricos mostraram que estes anticorpos, quando associados a esquema de imunossupressão tríplice com a ciclosporina, a azatioprina e a prednisona, reduzem em 30% os episódios de rejeição aguda nos seis primeiros meses de transplante renal. Além disso, diminuem a incidência de rejeições agudas esteróide-resistentes (KAHAN, RAJAGOPALAN, 1999, TAYLOR, WATSON, BRADLEY, 2005).

Os anticorpos bloqueadores da interleucina-2 podem ser quiméricos (humano/murino) como o basiliximab (Simulect<sup>®</sup>), ou humanizados, como o daclizumab (Zenapax<sup>®</sup>). O anticorpo humanizado tem a vantagem de não induzir à produção de anticorpo anti idiótipo e ter ação mais prolongada do que o quimérico, além de não causar reação de hipersensibilidade. São utilizados antes e logo após o transplante, com ação farmacológica que perdura durante 30 a 45 dias (basiliximab) ou até 90 dias (daclizumab) (KIRKMAN *et al*, 1991; TAYLOR; WATSON; BRADLEY; 2005).

### **2.3.6. Sirolimus**

É um antibiótico macrolídeo do fungo *Streptomyces higroscopicus* encontrado na ilha Rapa Nui, com potente atividade imunossupressora e anti-proliferativa. Penetra livremente nas células, unindo-se à mesma imunofilina do tacrolimus (FKBP12). Este complexo sirolimus-FKBP12 não inibe a calcineurina, mas bloqueia o sinal de transdução de uma proteína denominada mTOR (mammalian target of rapamycin), essencial para a proliferação dos linfócitos durante o ciclo celular. Sua atividade imunossupressora é exercida tardiamente no ciclo celular quando comparada a ciclosporina e tacrolimus levando a sua interrupção no final da fase G1, imediatamente antes da entrada na fase S (ETTENGER; GRIMM; 2001; TAYLOR; WATSON; BRADLEY, 2005). Agem como inibidores do sinal de proliferação de crescimento das células musculares lisas e linhagens hematopoiéticas. Em modelo pré-clínico o sirolimo foi capaz de reduzir a incidência e severidade de rejeição aguda quando associado a ciclosporina e tacrolimus, porém com efeito inesperado no que se refere a função renal, na medida em que pacientes

em uso de sirolimo apresentaram valores maiores de creatinina ao final do tratamento (OELLERICH *et al*, 2004; TAYLOR, WATSON, BRADLEY, 2005).

### **2.3.7. Ciclosporina**

A Ciclosporina (CSA), potente imunossupressor, é um decapeptídeo fúngico originado do *Tolypocladium inflatum* (BOREL, KIS 2001) e foi introduzido na década de 70 para provável uso em transplante de órgãos sólidos (SCHUTZ *et al*, 1998). No entanto, seu uso efetivo ocorreu em 1983 no European Multicenter Trial Group e, a partir desta data, vem melhorando substancialmente a sobrevida de doentes, pacientes submetidos a transplantes cardíaco, renal, hepático, pancreático e pulmonar (MCMILLAN, 1989).

O mecanismo de ação da ciclosporina é muito semelhante ao do tacrolimus . Ambos formam complexos com suas respectivas imunofilinas (ciclofilina e FKBP-12) e o complexo droga-receptor inibe a atividade fosfatase da calcineurina, uma enzima cálcio-calmodulina dependente, levando a redução na produção de interleucina 2 (IL-2). In vitro, o tacrolimus é 10 a 100 vezes mais potente que a ciclosporina (DUNN *et al*, 2001; SCOTT *et al*, 2003; TAYLOR; WATSON; BRADLEY; 2005).

A ciclosporina e o tacrolimus são extensamente metabolizados pelo fígado e mucosa intestinal através das isoenzimas do CYP3A4 e da glicoproteína P. Sendo assim, várias drogas metabolizadas pelo mesmo sistema podem alterar sua farmacocinética, pela inibição competitiva ou indução. Tal fator é extremamente

importante na prática clínica diária. Por exemplo, drogas bastante empregadas como os anti-fúngicos, anti-bacterianos, aumentam bastante os níveis dos inibidores de calcineurina. (DUNN *et al*, 2001).

Apesar das semelhanças entre ambos, existem algumas diferenças na incidência de efeitos colaterais. Por exemplo, a ciclosporina associa-se à ocorrência bastante freqüente de hiperplasia gengival e hipertricose, efeitos colaterais revertidos com a mudança para tacrolimus, aspecto bastante relevante na população de adolescentes (DUNN *et al*, 2001; SCOTT *et al*, 2003). Também foi observado que a prevalência de hipertensão e hiperlipidemia é menor com tacrolimus, quando comparado a ciclosporina.

Estudos publicados na fase inicial de introdução do tacrolimus sugeriam aumento na incidência dos casos de diabetes mellitus e doença linfo-proliferativa pós-transplante, provavelmente decorrente da alta exposição inicial do paciente a droga, então empregada em níveis sanguíneos acima dos níveis atualmente propostos. De fato, estudos mais recentes randomizados demonstraram incidência semelhante de diabetes mellitus (TANABE, 2003; TROMPETER, 2002; SCOTT *et al*, 2003) e doença linfo-proliferativa entre ambos (DUNN *et al*, 2001; SCOTT *et al*, 2003; TANABE, 2003).

Estudos recentemente publicados indicam ser a imunossupressão com tacrolimus mais eficaz quando comparada a CSA micro emulsão no que se refere à sobrevida do enxerto, incidência e severidade de rejeição aguda, função renal ao longo prazo, bem como rejeições córtico-resistentes (TROMPETER *et al*, 2002;

NEU *et al.*, 2003; KARI, TROMPETER, 2004). Outra forma de emprego do tacrolimus, não aplicável à ciclosporina, é na terapia de resgate dos episódios de rejeição aguda (SCOTT *et al.*, 2003).

### 2.3.8 Tacrolimus

O tacrolimus foi descoberto em 1987 pelos japoneses T. Goto, T. Kino e H. Hatanaka, encontrado em fungos presentes em solo japonês e é produzido a partir de um tipo de bactéria, *Streptomyces tsukubaensis*. Seu nome é devido a “Tsukuba macrolide immunosuppressant” (KINO *et al.*, 1987). É um antibiótico macrolídico que possui fórmula  $C_{44}H_{69}O_{12}$ , massa molecular de 804,018 g/mol (Figura 4), que possui potente atividade imunossupressora e anti-proliferativa (HOOKS, 1994). Não é um antimetabólito, ou seja, análogo estrutural (GOTO *et al.*, 1987).

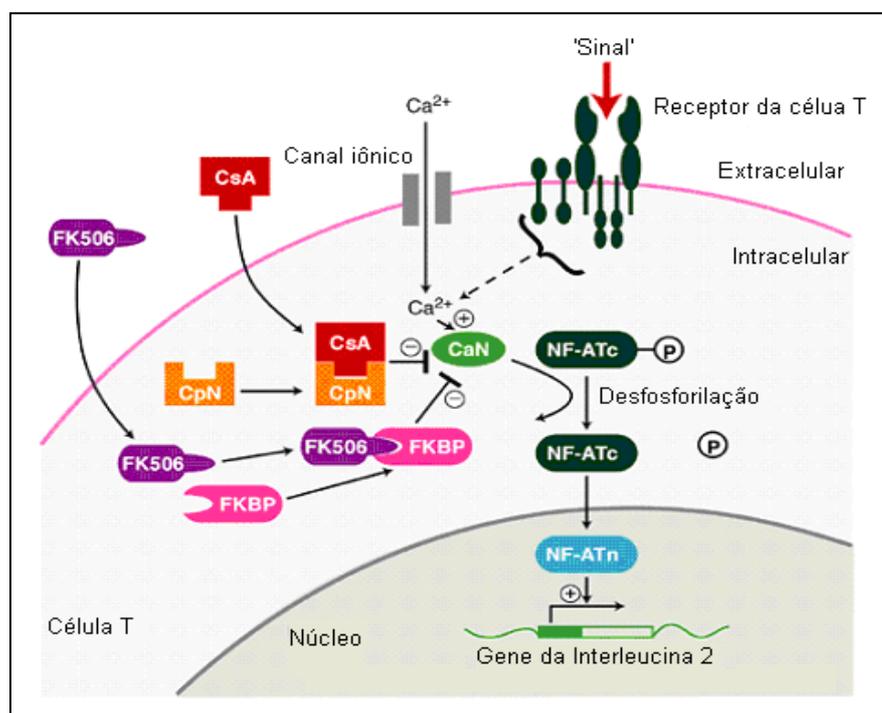
Produzido pela empresa Astellas Pharma Inc. e foi liberado pelo Food and Drug Administration (FDA) em 1994 para uso em transplante de fígado, mas é usado também para transplantes de rim, coração, pâncreas e outros.

É altamente lipofílico e apresenta uma farmacocinética variável. Após administração oral, sua absorção é pobre e incompleta, embora não seja influenciada pela bile o que representa uma vantagem particular dessa droga no transplante hepático. Sua concentração máxima é alcançada em 60 minutos, depois é distribuído pelo organismo ligado à proteínas plasmáticas e hemácias e posteriormente, sofre metabolização resultando mais de quinze metabólitos. A meia-



## Mecanismo de ação

O Tacrolimus (FK506) não atua “intrinsecamente” como imunossupressor, ele “adquire função” quando se liga a uma proteína intracelular (FKBP-12), que é uma imunofilina relacionada estruturalmente com a ciclofilina. Logo em seguida é formado um complexo FBK-12-tacrolimus, cálcio, calmodulina e calcineurina, como resultado ocorre à inibição da atividade da fosfatase desta última enzima. A inibição da fosfatase impede a desfosforilação e a translocação nuclear do NFAT que está envolvido na síntese de interleucinas, como a interleucina 2, pelas células T ativadas. Com a inibição da fosfatase citoplasmática, ocorre a inibição da ativação dos linfócitos T (PLOSKER; FOSTER, 2000).



**Fig. 5.** Mecanismo de ação da ciclosporina (CSA) e do tacrolimus (FK506). A ciclosporina e o tacrolimus ligam-se às imunofilinas ciclofilina e proteína de ligação do FK506 (FKBP-12 – fk-binding protein isoenzyme 12), respectivamente, formando um complexo que se liga à

calcineurina fosfatase e inibe a desfosforilação catalisada pela calcineurina (CaN), que é essencial a transferência do fator nuclear das células T ativadas (NFAT) para dentro do núcleo. O NFAT é necessário à transcrição da interleucina 2 e outras citocinas associadas ao crescimento e à diferenciação (linfocinas). NF-Atc – Componente citoplasmático do fator nuclear de linfócito T ativado; NF-Atn – Componente nuclear do fator nuclear de linfócito T ativado. Fonte: STEPKOWSKI (2000.)

Estudos multicêntricos têm demonstrado que essa droga, quando associada à azatioprina e ao micofenolato mofetil, diminui a incidência de rejeição aguda nos seis primeiros meses de transplante renal (PIRCH *et al.*, 1997; MAYER *et al.*, 1997; KNOLL; BELL, 1997; JONHSON *et al.*, 2000). Sua eficácia tem sido demonstrada como tratamento de resgate da rejeição aguda resistente ao tratamento convencional (VICENTI ; JENSI; FILO, 2002).

As doses orais iniciais recomendadas são de 0,2 mg/kg/dia para pacientes adultos que receberam transplantes renais. Em geral pacientes pediátricos, comparados com os adultos, necessitam de doses maiores. Estas doses são administradas por longos períodos para a manutenção do enxerto (SHAPIRO, 1998).

### ***Efeitos colaterais***

Os efeitos colaterais são freqüentes, especialmente disfunção renal, hiperglicemia e distúrbios neurológicos e mentais (VENKATARAMANAN, *et al.*, 1991).

O risco de ocorrência de infecções bacterianas, virais, fúngicas e por protozoários está aumentado em relação à população geral. Podem ocorrer novas infecções, localizadas ou generalizadas, ou infecções em curso podem ser agravadas após o uso desta droga (STAATZ, *et al.*, 2001).

O tacrolimus altera a hemodinâmica glomerular com redução da filtração, alteração em características histológicas caracterizadas pela presença de vacuolização tubular, fibrose intersticial e hialinose e com seu uso contínuo e em altas doses leva à nefrotoxicidade (BARROS *et al.*, 1987).

Disfunções renais agudas ou crônicas podem se manifestar por insuficiência renal aguda e crônica, síndrome hemolítico-urêmica, hematúria, proteinúria, hidronefrose e glomerulopatias diversas (SCOTT, *et al.*, 2003).

Hiperglicemia e diabetes insulino-dependente ocorrem em até 30% dos pacientes. Na maioria dos casos, ocorre melhora com a redução da dose dos imunossupressores (SCOTT, *et al.*, 2003).

Efeitos sobre o sistema nervoso central são igualmente freqüentes, especialmente tremores, cefaléia e parestesias. Quase sempre, esses efeitos limitam pouco as atividades cotidianas e respondem à redução da dose do fármaco. Convulsões não são raras, especialmente se coexiste infecção no sistema nervoso central ou se outras drogas neurotóxicas são co-administradas (ganciclovir e imipenem, principalmente). Pode ocorrer agitação, ansiedade, labilidade emocional, confusão mental, depressão ou euforia, distúrbios da cognição, pesadelos, insônia,

sonolência, vertigem, enxaquecas, mioclonias, amnésia e neuropatias periféricas (FRIEMANN, *et al.*, 1998; SCOTT, *et al.*, 2003).

A literatura relata a ocorrência de leucoencefalopatia fatal em uma mulher de 37 anos com 12 semanas de transplante cardíaco fazendo uso do tacrolimus. A hipótese é que a neurotoxicidade está associada à diminuição da barreira hematoencefálica (KACSMARECK *et al.*, 2003).

A hipertensão arterial sistêmica não é rara após o transplante de fígado, podendo ser desencadeada ou agravada pelo tacrolimus. Alguns casos de cardiomiopatia hipertrófica, principalmente em crianças, que desaparece com a interrupção do uso do medicamento, têm sido descritos. Distúrbios do ritmo cardíaco, infarto agudo do miocárdio, fenômenos tromboembólicos, entre outros, foram atribuídos ao fármaco, em casos isolados (FRIEMANN, *et al.*, 1998).

Anemia, leucopenia ou leucocitose, plaquetopenia, pancitopenia, eosinofilia, alargamento dos tempos de protrombina e tromboplastina podem ocorrer. Tromboses, sangramentos de vísceras e púrpura trombocitopênica trombótica foram descritos. Síndromes linfoproliferativas podem ocorrer, especialmente em crianças infectadas pelo vírus Epstein Barr, através do enxerto ou de hemoderivados administrados durante ou após o transplante (SCOTT, *et al.*, 2003).

Hipercalemia, hipomagnesemia e hiperuricemia são as alterações hidroeletrólíticas mais freqüentes. Foram relatadas a ocorrência de hipocalemia, hipo

ou hipernatremia, hipo ou hiperfosfatemia, aumento da amilase e da creatina fosfoquinase e alterações do equilíbrio ácido-base (SCOTT, *et al.*, 2003).

Náuseas, vômitos, diarreia e alterações das enzimas hepáticas também foram descritos. (ASTELLAS PHARMA US INC. 2005).

Febre, artralgias, mialgias, câimbras, astenia, ginecomastia, alopecia, prurido, catarata, fotofobia, diplopia, glaucoma, nistagmo e distúrbios da audição foram relatados (JANSSEN-CILAG FARMACÊTICA LTDA., 2000).

Casos isolados de insuficiência hepática aguda, cirrose e necrose hepática, pancreatite aguda, fibrose pulmonar eosinofílica, alcalose respiratória, entre outros efeitos incomuns foram descritos .

### ***Tacrolimus e Reprodução***

O Tacrolimus é transferido através da placenta (SATCHELL, *et al.*, 2000), sendo recomendado seu uso durante a gravidez, somente se o benefício para mãe justificar o risco potencial ao feto, já que estudos com animais demonstraram que este fármaco pode ser teratogênico (ALBENGRES; LE LOUET; TILLEMENT, 1997), levando a alterações no desenvolvimento do embrião (LEMÔNICA, 1996).

Jabiry-Zienniewicz *et al.* (2006), relataram sucesso em quatro gestações pós-transplante hepático, onde as pacientes estavam utilizando o tacrolimus. Não foram observados abortos espontâneos e só houve um episódio de rejeição aguda

em 23 semanas de gestação, mas que foi atribuído ao fato da paciente ter interrompido o uso do tacrolimus, o que não foi considerado como uma complicação decorrente da gravidez. A complicação mais comum foi o nascimento prematuro com baixo peso corporal. Não foram observadas malformações estruturais nos recém-nascidos.

Estudos semelhantes foram realizados por Gutiérrez *et al.* (2005) que observaram 43 gestações em 35 pacientes que haviam sofrido transplante renal e que apresentavam funcionamento normal dos mesmos. Houve 19 abortos, sendo nove espontâneos e dez, como indicação terapêutica devido às complicações maternas apresentadas. No total foram 24 gestações bem sucedidas, das quais oito gestações resultaram em nascimentos prematuros. A hipertensão arterial maternal foi a complicação mais observada, a preeclampsia ocorreu em nove gestações. Nenhum episódio de rejeição aguda foi observado.

Em estudos realizados em ratos e coelhos, foram observados efeitos adversos, quando foram utilizadas dosagens elevadas que foram tóxicas para as fêmeas. Foi associado à toxicidade materna quando administrado por via oral em doses de 0,32 e 1 mg/kg de tacrolimus durante o período de organogênese em coelhos e ainda ao aumento do número de abortos. Quando administrados a ratas, durante a organogênese, também na dosagem de 1,0 a 3,2 mg/kg (equivalente a 0,7-1,4 e 2,3-4,6 vezes a faixa de dose clínica recomendada baseada na adequação para a área da superfície corporal) por via oral, ocasionou toxicidade materna, aumento na reabsorção tardia, decréscimo no número de nascimentos vivos e diminuição no peso e na viabilidade dos filhotes (GEWIRTZ; SITARAMAN, 2002).

Não foram encontradas referências sobre os efeitos do tacrolimus no período entre a fertilização e a etapa de implantação do blastocisto.

## **2.4 ASPECTOS GERAIS DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO**

O desenvolvimento do mamífero tem início na fertilização, que culmina com a união dos pró núcleos feminino e masculino resultando na formação do zigoto, que ocorre normalmente na tuba uterina. Durante o percurso pela tuba uterina em direção ao útero, o zigoto sofre a clivagem sucessiva que origina a mórula e logo em seguida leva ao desenvolvimento do blastocisto precoce, estrutura que apresenta espaços entre os blastômeros internos (MOORE; PERSAUD, 2004)

O blastocisto se desenvolve através do aparecimento de cavitação entre os blastômeros da mórula. A princípio, quando a cavidade é rudimentar, o blastocisto é denominado de precoce ou inicial, e pode ser encontrado na tuba uterina, próximo a junção útero tubária, mas freqüentemente se encontra no útero (SOUZA; GUERRA; PETERS, 1997; MOORE; PERSAUD, 2004). Logo em seguida, a cavidade existente entre os blastômeros é ampliada dando origem ao blastocisto expandido, que apresenta estrutura que consta de trofoectoderma – camada celular externa; blastocele – cavidade interna - e maciço celular interno – aglomerado de células, agrupadas em um dos pólos. A zona pelúcida desaparece quando da implantação (MOORE; PERSAUD, 2004).

A fase que antecede a implantação, fase pré-implantação, representa um período de autonomia relativa do embrião. Nesta fase o embrião não depende apenas da circulação materna, mas necessita das secreções tubárias para sua manutenção e desenvolvimento e ainda de secreções autócrinas (O'NEILL, 1998).

Para que o blastocisto se desenvolva passando da fase inicial, ele precisa implantar-se no útero. Sua implantação é decorrente de uma série de interações bioquímicas e físicas entre o blastocisto e o útero, onde ocorre um contato íntimo com o endométrio (ACOSTA, 1994), que permite um intercâmbio de nutrientes e material de descarte (PARR; PARR, 1989).

No ser humano, a implantação do blastocisto se faz na região posterior e superior do útero enquanto que no rato, ocorre na região mesometrial do útero (MAGANHA; PETERS; GUERRA, 2002).

#### **2.4.1 Alterações do ambiente e suas conseqüências para o desenvolvimento embrionário.**

Na fase de pré-implantação, o embrião parece estar mais susceptível à letalidade do que à teratogenicidade. Segundo a World Health Organization (WHO,1984), durante a fase de pré-implantação, período entre a concepção e a implantação, o blastocisto parece ser muito sensível a ações de substâncias químicas, resultando em nenhum efeito ou em morte do blastocisto.

A resposta decorrente da toxicidade em humanos é o aborto espontâneo, dos quais cerca de 50% não são percebidos pela mulher (SHAPIRO; BROSS, 1980).

Calcula-se que cerca de 10 a 20% das gestações terminem em aborto (MANSON; KANG, 1994, MOORE; PERSAUD, 2004), determinando algum tipo de seleção natural, pois se sabe que mais de 90% dos fetos com malformações são abortados no início da gestação e que 60% dos abortos que ocorrem no primeiro trimestre da gestação têm anormalidades cromossômicas (WHO, 1984, BYRNE *et al.*, 1985 apud HOLMES, 1994).

Outros fatores, que interfiram com a produção hormonal adequada, com o ambiente químico uterino ou secreção de substâncias tóxicas no ambiente uterino podem resultar na morte do embrião. Segundo Lemônica (1996), a ingestão de drogas de abuso, alimentos contaminados ou fármacos, são causas conhecidas de malformações fetais, como exposto anteriormente.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 MODELO EXPERIMENTAL**

Foram usadas 120 ratas Wistar (*Rattus norvegicus*, Berkenhout,1769), nulíparas, com três meses de idade, pesando entre 190 e 230g, obtidas no Biotério do Centro de Biologia da Reprodução – Universidade Federal de Juiz de Fora.

As fêmeas foram inseminadas usando-se machos de fertilidade comprovada. A presença de espermatozóide no esfregaço vaginal realizado na manhã do dia seguinte ao acasalamento, foi tomada como constatação da inseminação e considerou-se este, o 1<sup>o</sup> dia de prenhez (TONG *et al.*, 2000, ROUT; ARMANT, 2002).

#### **3.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

As ratas inseminadas foram mantidas em gaiolas de polipropileno, providas de camas de maravalha selecionada; com mamadeira para água filtrada e cocho para ração do tipo peletizada. Para suprir a necessidade energética dos animais foi disponibilizado, em média, 25g de ração e 50ml de água por dia (Canadian Council on Animal Care. Guide to the care and use of experimental animals, 1996).

As gaiolas permaneceram em estantes climatizadas onde são controladas temperatura e ventilação. A iluminação da sala é mista, natural e

lâmpadas incandescentes, sendo as últimas controladas automaticamente para acenderem às 6:00 e apagarem às 18:00 horas.

As ratas inseminadas foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos GI e GII contendo 60 animais cada que foram submetidos aos procedimentos do Experimento I e II, respectivamente:

### ***Experimento I – Avaliação do período de pré-implantação (trânsito tubário)***

Os animais do Grupo GI foram subdivididos em 4 grupos, sendo um controle (C1) e 3 tratados (T1, T2 e T3).

Os animais do grupo Controle (C1) receberam 0,5 ml de água destilada administrada por via intragástrica, duas vezes ao dia, com intervalo de 12 horas.

Os animais do grupo tratado (T1, T2 e T3) receberam tacrolimus diluído em 0,5 ml de água destilada nas doses: dose 1 (1mg/Kg/dia), dose 2 (2mg/Kg/dia) e dose 3 (4mg/kg/dia), pela mesma via e intervalo de tempo. O tratamento foi feito do primeiro ao quinto dia de prenhez e a eutanásia no 15<sup>o</sup> dia de prenhez.

### ***Experimento II – Avaliação do período de implantação***

Os animais do Grupo GII foram subdivididos em quatro grupos. Grupo controle (C2) e tratados (T4, T5 e T6) com 15 animais cada. Estes animais receberam o mesmo tratamento feito aos do experimento I, ou seja, o grupo Controle

recebeu água destilada e os Tratados receberam a solução aquosa de tacrolimus nas mesmas concentrações, vias e intervalo de tempo descritos no experimento I, variando apenas o período de tratamento que foi realizado do 5<sup>o</sup> ao 7<sup>o</sup>-dia de prenhez. Os animais foram eutanaziados no 15<sup>o</sup> dia de prenhez.

### ***Eutanásia***

Realizou-se a eutanásia dos animais dos grupos experimentais I e II, no 15<sup>o</sup> dia de prenhez através de aprofundamento anestésico Ketamina (via intraperitoneal) e Xilazina (via intramuscular) nas doses de 10mg/kg a 2% e 100mg/kg a 5%, respectivamente. Foram observados os sinais de batimento cardíaco e respiração para constatação da morte dos mesmos.

### ***Procedência e Dose do Tacrolimus***

O Tacrolimus utilizado (Prograf®,- Jansen-Cilag Farmacêutica LTDA.) corresponde a cápsulas dos lotes 5C5133A, 5C5116B e 5C5131B, apresentadas em embalagens contendo 50 cápsulas de 5mg.

Para determinação da dose do Tacrolimus, considerou-se a dose utilizada por Ochiai *et al.* (1987), que relatam que a dose mínima efetiva necessária, quando administrado por via oral, para manutenção do transplante em ratos é de 1mg/kg/dia.

Foram administradas três doses distintas de Tacrolimus (FK506 – PROGRAF®), correspondendo a 1mg/Kg/dia, 2mg/Kg/dia e 4mg/kg/dia.

### **3.3 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE MATERNA**

Durante todo o período do experimento I e II, as fêmeas foram examinadas para avaliar sinais clínicos indicativos de toxicidade materna, tais como piloereção, movimentos estereotipados, alteração da motilidade do animal (durante 30 minutos após a administração do fármaco ou água), diarreia, perda de peso, redução de consumo de alimento, perdas sanguíneas vaginais e mortes.

O consumo de ração foi estimado pela diferença entre a quantidade colocada no cocho em um dia e o que restou no outro. O peso corporal foi obtido no primeiro dia de tratamento, ao término do tratamento e na data do sacrifício do animal.

Durante a anestesia para a eutanásia, amostra de sangue foi obtida por punção cardíaca, para análise hematológica e bioquímica de colesterol, triglicérides, TGO, TGP, uréia e creatinina.

Órgãos maternos, como o fígado e rim foram retirados e pesados para se observar possíveis sinais de toxicidade.

### **3.4 AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO**

Após a eutanásia dos animais nos Experimentos I e II, as ratas foram laparotomizadas, e foram removidos os cornos uterinos, ovidutos e ovários. Cada ovário foi pesado individualmente e os corpos lúteos contados em cada ovário. Os cornos uterinos foram seccionados longitudinalmente e seu conteúdo examinado para identificação de fetos vivos (presença de batimentos cardíacos), reabsorções e fetos mortos.

Fetos e placentas foram pesados, agrupados por ninhada e o peso médio obtido pela divisão do peso total pelo número de fetos e de placentas.

Após fixação em Bouin por cerca de 60 minutos, os fetos foram examinados sob microscópio estereoscópico para avaliar a morfogênese da face, dos membros e fechamento do tubo neural.

### **3.5 PROCESSAMENTO ESTATÍSTICO**

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística pelo teste ANOVA, uma via para comparação de dados contínuos, seguidos do teste de Dunnett ; teste de Kruskal Wallis para dados não paramétricos e teste de Chi-quadrado para computação de dados descontínuos. O nível de significância dos testes foi  $\alpha = 0,05$ .

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal-UFJF sob o nº035/2005.

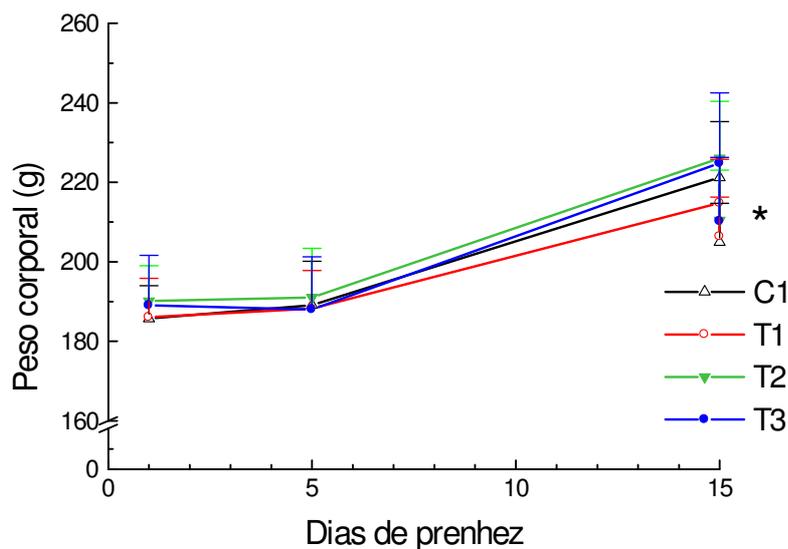
## 4. RESULTADOS

### 4.1 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE MATERNA

Não foram encontrados indícios clínicos de toxicidade materna, tais como, piloereção, alteração da motilidade, diarreia, movimentos estereotipados, perdas sanguíneas vaginais e mortes, nos experimentos I e II.

#### *Experimento I - Período de Trânsito tubário*

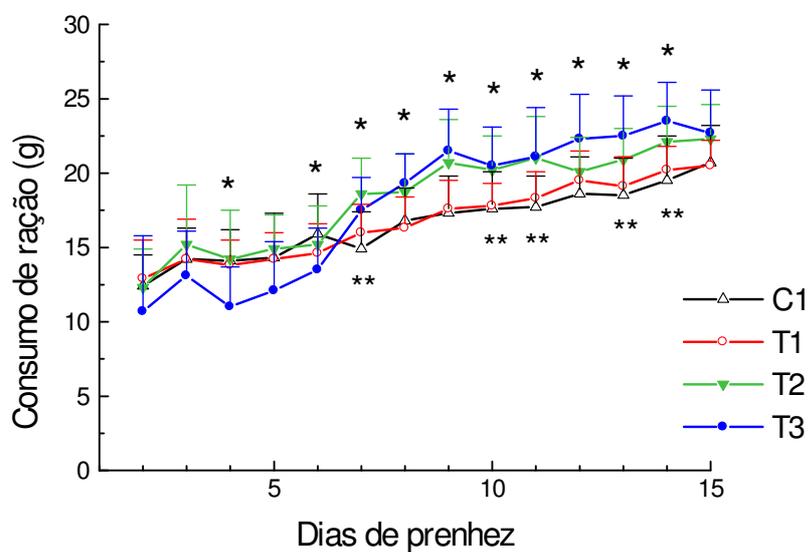
Os pesos corporais das ratas controles e tratadas com Tacrolimus em diferentes doses, no primeiro, no quinto e no 15<sup>o</sup> dia de prenhez antes e após a eutanásia são apresentados na Fig. 6.



**Fig. 6.** Peso corporal de ratas tratadas com água destilada (C1) e Tacrolimus 1,0 mg/kg/dia (T1), 2,0mg/kg/dia (T2) e 4,0mg/kg/dia (T3), do 1<sup>o</sup> ao 5<sup>o</sup> dia de prenhez. \*15<sup>o</sup> dia peso corporal sem trato reprodutor.

Não houve alteração significativa em relação ao peso corporal entre os grupos.

A Fig. 7 representa a estimativa de consumo de ração pelas mães tratadas do primeiro ao quinto dia.



**Fig. 7.** Consumo de ração de ratas tratadas com água destilada (C1) e Tacrolimus 1,0 mg/kg/dia (T1), 2,0mg/kg/dia (T2) e 4,0mg/kg/dia (T3), do 1º ao 5º dia de prenhez.

Observando a Fig. 7 nota-se que os grupos C1, T1 e T2, apresentaram consumo semelhante durante os cinco primeiros dias, equivalentes aos dias de tratamento, sendo que os grupos T2 e T3 tiveram um aumento no consumo no terceiro dia de tratamento. Os grupos C1 e T1 mantiveram um consumo crescente e com valores semelhantes, durante o experimento. A partir do sexto dia, os grupos T2 e T3 consumiram mais ração do que os grupos controle e T1. Entretanto estas flutuações não apresentam significado biológico.

Na Tabela 1 encontram-se os parâmetros hematológicos das ratas tratadas do primeiro ao quinto dia de prenhez, e no dia da eutanásia.

**Tabela 1.** Parâmetros hematológicos de ratas tratadas com água destilada (C1) e Tacrolimus 1,0 mg/kg (T1), 2,0mg/kg (T2) e 4,0mg/kg/dia (T3), do 1<sup>o</sup> ao 5<sup>o</sup> dia de prenhez, e no dia da eutanásia.

<b>Parâmetros hematológicos</b>	<b>Controle 1 n(15)</b>	<b>Tratado 1 n(15)</b>	<b>Tratado 2 n(15)</b>	<b>Tratado 3 n(15)</b>
Hematimetria (milhões/mm <sup>3</sup> )	6.26±0,68	5.40±1,56	6,44±5,51	6.44±1,31
Hematócrito (%)	38,60±2,06	38,53±2,50	40,27±3,10	39,47±2,61
Leucócitos totais (cel/mm <sup>3</sup> )	5873±2890	6440±3634	6324±9399	4966±1486
Linfócitos (%)	62,47±10,24	62,73±7,66	59,33±7,56	62,00±8,43
Segmentados (%)	31,93±8,14	30,60±7,95	33,93±7,63	32,27±8,22
Bastonete (%)	1,87±1,25	2,40±1,24	3,07±1,49	2,73±1,22
Eosinófilo (%)	0,93±1,62	1,33±1,80	1,33±1,11	1,60±1,30
Monócito (%)	2,20±1,97	3,00±2,14	2,33±1,34	1,40±0,91
Hemoglobina (g/dL)	12,05±0,75	11,61±1,03	11,94±0,57	12,03±0,72
VGM (μ <sup>3</sup> )	63,00±8,67	77,93±29,79	65,20±8,78	62,93±10,05
HGM (mg)	19,73±2,68	23,60±8,45	18,67±1,29	19,07±2,84
CHGM (%)	31,40±2,29	30,60±2,53	29,07±2,52	30,60±2,74

Resultados expressos em média ± desvio padrão (número de casos)

VGM = Volume corpuscular médio; HGM = Hemoglobina corpuscular média; CHGM = Concentração de hemoglobina corpuscular média.

Não houve diferenças significativas em relação aos parâmetros hematológicos analisados entre os grupos acima citados.

Na Tabela 2 estão relacionados os parâmetros bioquímicos das ratas tratadas do primeiro ao quinto dia de prenhez, e no dia da eutanásia.

**Tabela 2.** Parâmetros bioquímicos de ratas tratadas com água destilada (C1) e Tacrolimus 1,0 mg/kg/dia (T1), 2,0mg/kg/dia (T2) e 4,0mg/kg/dia (T3), do 1<sup>o</sup> ao 5<sup>o</sup> dia de prenhez, e no dia de eutanásia.

<b>Parâmetros bioquímicos</b>	<b>Controle 1 n(15)</b>	<b>Tratado 1 n(15)</b>	<b>Tratado 2 n(15)</b>	<b>Tratado 3 n(15)</b>
Colesterol mg/dl	49,65±11,49	69,35±19,88	63,26±26,98	61,41±13,52*
Triglicérides mg/dl	165,87±59,91	133,07±82,17	148,80±70,24	148,77±105,38
TGO U/L	83,80±44,95	74,80±39,44	46,53±17,43*	48,67±12,49*
TGP U/L	39,93±10,85	42,27±11,93	37,07±7,25	38,33±9,04
Uréia mg/dl	60,67±8,22	54,20±12,62	58,60±9,91	48,33±10,54*
Creatinina mg/dl	0,52±0,14	0,58±0,19	0,45±0,05	0,32±0,09*

Resultados expressos em média ± desvio padrão (número de casos). \*p<0,05 em relação ao grupo controle .

Houve redução de creatinina entre no grupo T3, da concentração plasmática TGO nos grupos T1, e T3, na concentração de uréia no grupo T3 e de colesterol no grupo T3.

A Tabela 3 mostra o peso corporal corrigido e de órgãos maternos das ratas tratadas do primeiro ao quinto dia.

**Tabela 3.** Peso corporal corrigido e de órgãos maternos em ratas Controles (C1) e tratadas com Tacrolimus 1,0 mg/kg/dia (T1), 2,0mg/kg/dia (T2) e 4,0mg/kg/dia (T3), do 1<sup>o</sup> ao 5<sup>o</sup> dia de prenhez.

Peso (g)	Controle1	Tratado 1	Tratado 2	Tratado 3
Corporal				
Corrigido	204,9±9,84(15)	206,3±9,97(15)	210,4±12,67(15)	210,2±16,07(15)
Fígado	9,2±0,84(15)	8,9±0,62(15)	9,2±1,11(15)	9,2±1,03(15)
Rim D	0,7±,06(15)	0,7±0,07(15)	0,8±0,08(15)	0,8±0,10(15)
Rim E	0,7±0,07(15)	0,7±0,08(15)	0,8±0,07(15)	0,8±0,10(15)
Rins D+E	1,5±0,12(30)	1,5±0,15(30)	1,6±0,15(30)	1,8±0,20(30)

Resultados expressos em média ± desvio padrão (número de casos).

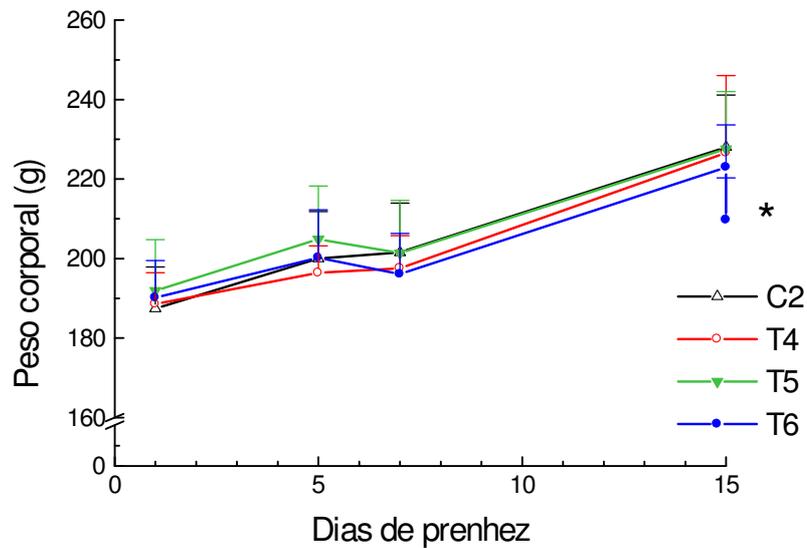
Peso corporal corrigido = peso corporal sem útero, ovários e tubas.

Rim D = rim direito; Rim E = rim esquerdo; Rim (D+E) = rim direito + esquerdo.

Observando-se peso corporal materno corrigido e pesos de órgãos, verifica-se que não ocorreram diferenças significativas entre os grupos.

### ***Experimento II - Período de implantação do blastocisto***

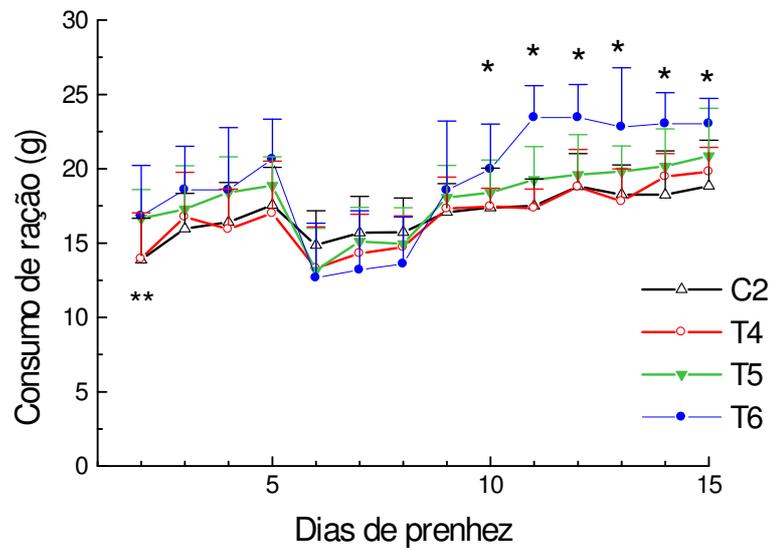
Na Fig. 8 encontram-se relacionados os pesos corporais das ratas controles (C2) e tratadas (T4, T5 e T6) com Tacrolimus em diferentes doses, no quinto e no sétimo dia e, ainda, no 15<sup>o</sup> dia de prenhez antes e após a retirada do trato reprodutor.



**Fig. 8.** Peso corporal de ratas tratadas com água destilada (C2) e Tacrolimus 1,0 mg/kg (T4), 2,0mg/kg (T5) e 4,0mg/kg/dia (T6), do 5<sup>o</sup> ao 7<sup>o</sup> dia de prenhez. \*Peso corporal após remoção do trato reprodutor. \*p<0,05.

Não foram observadas variações no peso corporal dos grupos analisados sendo que todas as ratas ganharam peso entre o início da gestação, o tratamento e a data da eutanásia.

Na Fig. 9 encontra-se o consumo de ração de ratas tratadas com água destilada (C2) e Tacrolimus 1,0 mg/kg/dia (T4), 2,0mg/kg/dia (T5) e 4,0mg/kg/dia (T6), do 5<sup>o</sup> ao 7<sup>o</sup> dia de prenhez.



**Fig. 9.** Consumo de ração de ratas tratadas com água destilada e Tacrolimus do 5<sup>o</sup> ao 7<sup>o</sup> dia de prenhez. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle .

Nota-se a queda do consumo de ração no dia subsequente ao tratamento com água destilada e Tacrolimus em todos os grupos tratados do quinto ao sétimo dia. Entre o sexto e o oitavo dia o consumo aumentou gradativamente, sendo que do nono dia até o final do experimento, este consumo foi intensificado, com destaque para o grupo T6 que apresentou consumo médio superior aos demais grupos.

A Tabela 4 apresenta os dados referentes aos parâmetros hematológicos de ratas tratadas do 5<sup>o</sup> ao 7<sup>o</sup> dia de prenhez, e no dia da eutanásia.

**Tabela 4.** Parâmetros hematológicos de ratas tratadas com água destilada (C2) e Tacrolimus 1,0 mg/kg (T4), 2,0mg/kg (T5) e 4,0mg/kg/dia (T6), do 5<sup>o</sup> ao 7<sup>o</sup> dia de prenhez.

<b>Parâmetros hematológicos</b>	<b>Controle 2 n(15)</b>	<b>Tratado 4 n(15)</b>	<b>Tratado 5 n(15)</b>	<b>Tratado 6 n(15)</b>
Hematimetria (milhões/mm <sup>3</sup> )	6,03±0,84	6,31±0,57	6,99±1,17	6,03±1,61
Hematócrito (%)	39,40±3,02	37,87±2,07	38,87±2,07	38,00±3,09
Leucócitos totais (cel/mm <sup>3</sup> )	6063 ±910	6033±1769	7003±275	4796±1163
Linfócitos (%)	62,60±10,21	62,33±94,81	59,07±6,23	62,93±6,25
Segmentados (%)	31,20±9,81	30,73±8,47	32,13±4,52	31,27±6,28
Bastonete (%)	2,33±1,11	2,87±1,81	2,93±1,28	2,73±1,33
Eosinófilo (%)	1,33±1,40	1,27±1,71	1,47±1,25	0,60±0,91
Monócito (%)	2,53±1,92	2,20±2,27	4,33±1,45	2,40±1,92
Hemoglobina (g/dL)	12,34±0,66	12,32±0,76	12,59±1,10	12,63±1,31
VGM (μ <sup>3</sup> )	64,73±6,54	60,13±4,31	56,80±7,88	59,93±17,77
HGM (mg)	20,27±1,98	20,00±2,59	18,33±2,02	23,00±8,94
CHGM (%)	31,47±3,11	32,80±1,47	32,33±2,35	33,40±4,01

Resultados expressos em média ± desvio padrão (número de casos).

VGM = Volume corpuscular médio; HGM = Hemoglobina corpuscular média; CHGM = Concentração de hemoglobina corpuscular média.

Os resultados obtidos não demonstraram alterações significativas entre os grupos experimentais.

Na Tabela 5 estão descritos os dados referentes aos parâmetros bioquímicos das ratas tratadas do 5<sup>o</sup> ao 7<sup>o</sup> dia de prenhez, e no dia de eutanásia.

**Tabela 5.** Parâmetros bioquímicos de ratas tratadas com água destilada (C2) e Tacrolimus 1,0 mg/kg/dia (T4), 2,0mg/kg/dia (T5) e 4,0mg/kg/dia (T6), do 5<sup>o</sup> ao 7<sup>o</sup> dia de prenhez, e no dia de eutanásia.

<b>Parâmetros</b>	<b>Controle 2</b>	<b>Tratado 4</b>	<b>Tratado 5</b>	<b>Tratado 6</b>
<b>bioquímicos</b>	<b>n(15)</b>	<b>n(15)</b>	<b>n(15)</b>	<b>n(15)</b>
Colesterol mg/dl	67,13±16,14	71,82±24,85	121,17±222,74	58,97±28,43
Triglicérides mg/dl	168,13±77,14	130,00±47,66	221,73±139,11	146,87±69,20
TGO U/L	67,80±18,92	67,33±12,63	79,80±40,46	44,93±18,59*
TGP U/L	37,07±11,76	37, ±13,92	29,00±11,56	32,20±8,12
Uréia mg/dl	61,27±30,73	61,33±11,81	62,73±9,53	50,20±11,80
Creatinina mg/dl	0,54±0,15	0,55±0,13	0,49±0,10	0,50±0,34

Resultados expressos em média ± desvio padrão

\* p<0,05 em relação ao grupo controle

Os parâmetros bioquímicos acima analisados não apresentaram alterações relevantes entre os grupos experimentais, exceto os resultados referentes à TGO, reduzido no T6.

Encontram-se descritos na Tabela 6, os valores relativos ao peso de órgãos maternos das ratas tratadas do quinto ao sétimo dia.

**Tabela 6.** Peso de fígado, rins e ovários de ratas tratadas com água destilada (C2) e Tacrolimus 1,0 mg/kg (T4), 2,0mg/kg (T5) e 4,0mg/kg/dia (T6), do 5<sup>o</sup> ao 7<sup>o</sup> dia de prenhez.

<b>Peso de</b>	<b>Controle 2</b>	<b>Tratado 4</b>	<b>Tratado 5</b>	<b>Tratado 6</b>
<b>órgãos</b>				
<b>maternos</b>				
Corporal corrigido (g)	210,69±11,78(15)	204,95±11,00(15)	212,53±14,00(15)	209,72±10,56(15)
Fígado (g)	8,72±0,66(15)	8,62±0,65(15)	8,72±0,75(15)	8,94±0,72(15)
Rim D (g)	0,73±0,00(15)	0,72±0,06(15)	0,77±0,06(15)	0,76±0,09(15)
Rim E (g)	0,71±0,07(15)	0,71±0,05(15)	0,76±0,07(15)	0,75±0,09(15)
Rins D+E (g)	1,45±0,13(30)	1,43±0,11(30)	1,54±0,12(30)	1,51±0,19(30)

Resultados expressos em média ± desvio padrão (número de casos).

Peso corporal corrigido = peso corporal sem útero, ovários e tubas.

Rim D = rim direito; Rim E = rim esquerdo; Rim (D+E) = rim direito + esquerdo.

Não foram observadas diferenças significativas nos pesos dos órgãos maternos.

## 4.2 AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

### *Experimento I - Período de Trânsito tubário*

A Tabela 7 apresenta o número médio de corpos lúteos, implantes, fetos vivos, reabsorções iniciais e tardias, proporção de implantação e perdas pré-implantação nos grupos C1, T1, T2 e T3, tratados do primeiro ao quinto dia de prenhez.

**Tabela 7.** Peso de ovários, número de corpos lúteos, fetos vivos e mortos em ratas Controles (C1) e tratadas com Tacrolimus 1,0 mg/kg/dia (T1), 2,0mg/kg/dia (T2) e 4,0mg/kg/dia (T3), do 1<sup>o</sup> ao 5<sup>o</sup> dia de prenhez.

Variáveis	Controle1	Tratado 1	Tratado 2	Tratado 3
Ovário D (mg)	37,3±10,93(15)	38,0±13,95(15)	39,0±11,03(15)	41,2±7,97(15)
Ovário E (mg)	38,4±12,26(15)	72,1±84,13(15)	38,3±14,17(15)	33,0±6,70(15)
Ovários D+E (mg)	75,7±9,81(30)	110,1±86,71(30)	77,3±11,55(30)	74,1±9,90(30)
Ovário D (mg)	37,3±10,93(15)	38,0±13,95(15)	39,0±11,03(15)	41,2±7,97(15)
Corpos lúteos	12,27±1,43(15)	12,13±1,81(15)	13,60±1,72(15)	13,73±2,22(15)
Fetos vivos	10,40±0,64	9,47±2,75	11,13±2,32	10,47±2,90
Fetos mortos	0	0	0	0

Resultados expressos em média ± desvio padrão (número de casos).

Os resultados obtidos e expressos na Tabela 7 não demonstraram diferença significativa entre os grupos.

Na Tabela 8 observam-se os dados referentes a reabsorções iniciais e tardias, peso de ninhada e de placenta, proporção de implantação, perdas pré-implantação nos grupos C1, T1, T2 e T3, tratados do primeiro ao quinto dia de prenhez.

**Tabela 8.** Reabsorções, peso de ninhada e placenta, número de implantes, proporção de implantação e de perdas pré-implantação em ratas Controles(C1) e tratadas com Tacrolimus 1,0 mg/kg/dia (T1), 2,0mg/kg/dia (T2) e 4,0mg/kg/dia (T3), do 1<sup>o</sup> ao 5<sup>o</sup> dia de prenhez.

Variáveis	Controle1	Tratado 1	Tratado 2	Tratado 3
Reabsorções iniciais	0,53±0,74(15)	0,47±0,83(15)	0,73±1,03(15)	0,60±0,63(15)
Reabsorções tardias	0,27±0,60(15)	0(15)	0,13±0,35(15)	0,20±0,41(15)
Peso da ninhada (g)	1,85±0,57(15)	2,18±0,49(15)	1,93±0,53(15)	1,97±0,53(15)
Peso de placenta (g)	1,65±0,40(15)	1,53±0,42(15)	1,76±0,39(15)	1,56±0,40(15)
Implantes	11,73±1,62(15)	10,33±2,77(15)	12,00±2,14(15)	11,27±3,28(15)
Proporção de implantação (%)*	95,93±9,67(15)	86,27±22,22(15)	88,26±11,13(15)	82,04±20,20(15)
Perdas pré- implantação(%)**	4,07±9,67(15)	13,73±22,22(15)	11,74±11,13(15)	17,96±20,20(15)

Resultados expressos em média ± desvio padrão (número de casos). \*(n<sup>o</sup> de implantes/n<sup>o</sup> de corpos lúteos) x 100. \*\*(n<sup>o</sup> de corpos lúteos - n<sup>o</sup> de implantes/n<sup>o</sup> de corpos lúteos) x 100.

Os resultados não demonstraram diferença significativa entre as variáveis avaliadas nos grupos experimentais.

Não foram observadas malformações relativas à face, membros ou fechamento do tubo neural.

### ***Experimento II - Período de Implantação do blastocisto***

A média do número de corpos lúteos totais, de reabsorções iniciais e tardias e de implantes totais encontram-se na Tabela 9.

**Tabela 9.** Peso de ovários, número de corpos lúteos, fetos vivos e mortos, reabsorções, peso de ninhada e placenta, número de implantes e de perdas pós-implantação em ratas Controle (C2) e Tratadas com Tacrolimus 1,0mg/kg/dia (T4), 2,0mg/kg/dia (T5) e 4,0mg/kg/dia (T6), do 5<sup>o</sup> ao 7<sup>o</sup> dia de prenhez.

Variáveis	Controle 2	Tratado 4	Tratado 5	Tratado 6
Ovário D (mg)	41,13±10,40(15)	38,20±8,42(15)	37,33±9,86(15)	41,87±6,91(15)
Ovário E (mg)	57,87±78,42(15)	33,47±11,54(15)	0,40±10,51(15)	36,33±8,88(15)
Ovários D+E (mg)	99,00±75,00(15)	71,67±12,19(15)	72,73±11,72(15)	78,20±7,23(15)
Corpos lúteos	13,0±1,77(15)	12,20±2,37(15)	12,47±1,56(15)	13,27±1,75(15)
Fetos vivos	11,33±2,87	9,67±2,82	10,27±1,39	11,60±1,68
Fetos mortos	0	0	1	0
Reabsorções iniciais	1,07±1,67(15)	0,80±1,8(15)	0,87±0,64(15)	0,33±0,62(15)
Reabsorções tardias	0(15)	0,27±0,80 (15)	0,07±0,26(15)	0,07±0,26(15)
Peso da ninhada (g)	2,15±0,45(15)	1,86±0,56(15)	1,94±0,29(15)	2,28±0,42(15)
Peso de placenta (g)	1,83±0,36(15)	1,54±0,41(15)*	1,62±0,29(15)*	1,88±0,31(15)
Implantes	12,40±1,99(15)	10,67±1,84(15)*	11,53±1,41(15)	12,00±1,36(15)
Perdas pós-implantação (%)**	9,25±14,91	8,58±21,68	10,77±7,99	3,52±6,56

Resultados expressos em média ± desvio padrão (número de casos). D= direito; E= esquerdo.

\*p<0,05 em relação ao grupo controle. \*\*( $n^{\circ}$  implantes -  $n^{\circ}$  de fetos vivos/ $n^{\circ}$  de implantes) x 100.

Notou-se redução do peso da placenta no grupo T4 e T5 e de implantes no grupo T4, quando comparados com o controle.

Após o exame sob microscópio estereoscópico, não foram identificadas alterações na morfogênese externa dos fetos.

## 5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

### 5.1 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO TACROLIMUS SOBRE O ORGANISMO MATERNO

Alterações na homeostasia, nos níveis hormonais ou alterações comportamentais maternas podem causar alterações no desenvolvimento embriofetal (KHERA, 1987), havendo demonstrações de correlação de malformações fetais que ocorrem com baixa frequência (exencefalia, encefalocele, micro ou anaftalmia e outras) a redução do peso materno (KHERA, 1985). Normalmente são considerados indícios de toxicidade materna a diminuição do peso corporal, do consumo de ração e água, alteração da deambulação na gaiola, piloereção, diarreia e mortalidade materna (MANSSON, KANG, 1994; CHAHOUD *et al*, 1999).

Entre os efeitos colaterais do tacrolimus encontram-se nefrotoxicidade (BARROS *et al.*, 1987), neurotoxicidade (KACSMAREK, *et al.*, 2003), hipertensão arterial (FRIEMANN *et al.*, 1998) que caso ocorressem nos animais tratados com tacrolimus poderiam alterar tanto o comportamento quanto o metabolismo materno. Entretanto, os indicadores de toxicidade, estresse ou distresse materno não foram observados, exceto a redução do consumo de ração o que parece indicar que se houve alguma alteração, ela foi restrita a administração do imunossupressor, mas não a uma alteração com significado biológico.

Tais observações associadas à ausência de alterações hematológicas parece sugerir que o imunossupressor não causa toxicidade materna (MENENDEZ, 1985), confirmando os resultados de Fujimura e Ebihara (1994) e Uchida *et al.* (1999).

Taylor *et al* (2005) relatam que o tacrolimus apresenta efeitos adversos dose-dependente e relacionados com os locais de maior concentração da calcineurina, como no cérebro e nos rins. O tacrolimus, portanto, estaria associado à neurotoxicidade e nefrotoxicidade e este é um dos mais importantes efeitos colaterais após o transplante renal. Foi descrito o aumento das concentrações de uréia e creatinina em ratas tratadas com tacrolimus (FUJIMURA, EBIHARA, 1994; UCHIDA *et al*, 1999), entretanto, no presente trabalho entre os grupos experimentais, o peso dos rins foi semelhante e o grupo tratado com dose mais elevada de tacrolimus (4mg/kg/dia) teve redução da concentração de creatinina e uréia, o que parece contradizer o efeito nefrotóxico.

A hiperlipidemia relatada por Taylor *et al.* (2005) parece se confirmar visto que em todos os grupos tratados do primeiro ao quinto dia foi constatado aumento da concentração de colesterol, embora a diferença significativa com o grupo controle só tenha aparecido nos animais do grupo tratado com 1mg/Kg/dia (T1) do fármaco.

Em síntese, os dados obtidos do estudo materno parecem indicar que o tacrolimus não teve efeito tóxico observável, sobre o organismo materno.

Alterações hormonais maternas podem interferir com o desenvolvimento embrionário. No modelo experimental utilizado a análise de concentrações hormonais não foi realizada, mas observações indiretas, como o peso de ovários, número de corpos lúteos, índices de implantação e de reabsorção, permitem sugerir que os grupos experimentais foram semelhantes.

Os corpos lúteos de ratas aumentam de volume ao longo da prenhez e estão intimamente correlacionados com o aumento de secreção de progesterona e 20-hidroxi progesterona (UCHIDA *et al.*,1970), hormônios necessários para a manutenção da gestação (KATO *et al.* 1979) necessária ao êxito da gestação (KELLER, 2006). Por outro lado, o número de corpos lúteos da gestação pode ser tomado como um indicativo indireto do número de ovulações. Sendo semelhante entre os grupos experimentais, indica que o número de ovulações foi semelhante entre os grupos e os processos hormonais envolvidos com a ovulação foram semelhantes. Como no presente trabalho não houve diferença estatística significativa, entre no peso dos ovários e do número de corpos lúteos, pode-se sugerir que as condições hormonais de todos os grupos foram semelhantes.

Como os corpos lúteos são estruturas mais volumosas do ovário, seu número e tamanho respondem pelo peso dos ovários o qual pode ser tomado como uma indicação indireta da produção hormonal. Tomados em conjunto, os dados maternos sugerem que o tacrolimus não parece interferir com a homeostase materna, contrariando as observações de GEWIRTZ; SITARAMAN (2002) que relataram toxicidade em ratas tratadas com a dose máxima de 3,2mg/kg.

## 5.2 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO TACROLIMUS SOBRE O EMBRIÃO

É conhecido que o tacrolimus cruza a placenta (SATCHELL *et al.*, 2000) e chega até o feto, podendo causar teratogenicidade (ALBENGRES; LELOUET; TILLEMENT, 1997), embora estudos em humanos não tenham evidenciado malformações ou abortos (ZABIRY-ZIENNIEWICZ *et al.*, 2006; GUTIERREZ *et al.*, 2005). Em ratas e coelhos o tratamento com tacrolimus durante o período de organogênese causou aborto, perda de peso e mortes (GERWITZ; SITARAMANN, 2002). O período em que se administrou o tacrolimus a ratas, compreende a fertilização, clivagens iniciais, mórula e blastocisto. De maneira geral, toxicantes que atuam nessa fase do desenvolvimento induzem a morte do concepto ou produzem alterações genéticas que podem ou não levar a malformações (CHRISTIAN, 2001).

A morte durante a fase precoce do desenvolvimento pode ser inferida pelo menor número de implantes no útero ou pelo aumento do índice de perdas embrionárias que é estimado tomando cada corpo lúteo como indicativo de um ovócito que, sendo fecundado, geraria um zigoto (KELLER, 2006). A diferença entre corpos lúteos e implantes nos cornos uterinos indica, aproximadamente, o número de conceptos que se inviabilizaram (TYL; MARR, 2005). Os dados obtidos no trabalho mostram que a média de implantes por mãe e o índice de perdas embrionárias pré-implantação foram semelhantes em todos os grupos estudados do Experimento I, sugerindo, portanto, que o tacrolimus não altera o desenvolvimento do concepto na fase de pré-implantação.

Confirmando essa sugestão, a proporção de implantes, que correlaciona o número de corpos lúteos com o número de implantações no útero (TYL; MARR, 2005) foi semelhante em todos os grupos do Experimento I, o que significa que os blastocistos encontraram condições adequadas para se implantar e expressar o seu desenvolvimento. Além disso, o índice de reabsorção, que determina o número de implantes que não sobreviveram, também não apresentou diferença significativa entre os grupos do Experimento I.

Embora, no Experimento II, tenha se constatado uma redução estatisticamente significativa no número de implantes do grupo tratado com 1mg/Kg/dia (T4), o dado pode não ter importância biológica visto que a variação apresentada encontra-se dentro dos limites históricos da colônia de ratas do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução.

A placenta tem um importante papel no desenvolvimento fetal, pois fornece os nutrientes necessários para este desenvolvimento, entre outras funções. Foi demonstrada uma íntima relação entre o peso fetal e placentário em humanos (THOMPSON *et al.*, 1969), porcos (SANIN *et al.*, 2001), coelhos (BRUCE, ABDUL, 1973) e roedores (GILBERT, LETURQUE, 1982). Foi descrito também que o crescimento placentário anormal alterou o desenvolvimento fetal de humanos (ORNOY *et al.*, 1981) e de camundongos (BURGOYNE, TAMS, EVANS, 1983). Embora o peso placentário tenha sido reduzido nos grupos tratados com tacrolimus (1,0 e 2,0 mg/kg), isto não se refletiu no peso da ninhada. Os dados encontrados contrastam com os observados por Gewitz; Sitaraman (2002) que tratando ratas no período de organogênese com 1 a 3,2mg/kg de tacrolimus/ kg peso corporal

encontraram efeito tóxico materno, aumento de mortes embrionárias. A diferença pode ser devido a época da gestação em que os autores administraram o tacrolimus. Sabe-se que no período inicial da prenhez o conceito naturalmente morre ou sobrevive (com ou sem lesões funcionais) enquanto que no período de organogênese ele é mais susceptível a lesão.

Considerando que no presente modelo experimental as mães foram expostas ao tacrolimus no período de divisões celulares iniciais, fase de mórula e de implantação do blastocisto, lesões mais severas poderiam levar à morte do embrião ou alterações genéticas e, ou, moleculares que poderiam se refletir na morfologia ou na função de órgãos e sistemas. Sob o ponto de vista morfológico, o feto de 15 dias não aparentava qualquer alteração externa digna de nota, inclusive quanto ao peso corporal.

Pode-se concluir que no modelo experimental usado não foram encontradas alterações sugestivas de efeitos do tacrolimus seja sobre o organismo materno seja sobre o desenvolvimento do conceito. A redução do peso da placenta será objeto de novos estudos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, A. A. Implantación humana del pre-embrión: aspectos básicos clínicos e investigación futura. **Revista latino americana de esterilidad y fertilidad**, v. 8, n. 1, p. 4-20, 1994.

ALBENGRES, E.; LE LOUET, H.; TILLEMENT, J. P. Immunosuppressive drugs and pregnancy: Experimental clinical data. **Transplant Proc**, v. 29, p. 2461–2466, 1997.

ARMENTI, V.T. Immunosuppression and teratology: Evolving guidelines. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 15, p. 2759-2760, 2004.

BARROS, E. J. et al. Glomerular hemodynamics and hormonal participation on cyclosporine nephrotoxicity. **Kidney Int.**, v. 32, n. 1, p. 19-25, 1987.

BOREL, J. F.; KIS, Z. L. The discovery and development of cyclosporine (Sandimmune). **Transplant Proc**, v. 23, n. 2, p. 1867-74, 1991.

BROCAS, C. *et al.* Deleterious action of gossypol on bovine spermatozoa, oocyte, and embryos. **Biol. Reprod.**, v. 57, p. 901-907, 1997.

BRUCE, N. W; ABDUL, K. Relationships between fetal weight, placental weight and maternal circulation in the rabbit at different stages of gestation. **J Reprod Fertil.**, v.32: p.15-24, 1973.

BURGOYNE, P.; TAM, P.P.L.; EVANS, E. P. Retarded development of conceptuses during early pregnancy in the mouse. **J Reprod Fertil.**, v.68, p.387–93, 1983.

BYRNE, J. *et al.* Morphology of the early fetal deaths and their chromosomal characteristics. **Teratology**, v. 32, p. 297-315, 1985. *apud*: HOLMES, L.B.

Developmental toxicology scope of the problem In: KIMMEL, C.A., BUELKE-SAM, J. **Dev. Toxicol.**, 2 ed. New York: Raven Press, 1994. 312p.

CALDEYRO-BARCIA, R. Prólogo p.xi-xiv. In: MACIÁ, J. M. C. *et al.* **Biología y ecología-fetal.** Barcelona: Salvat, 1981. 888p.

CALLES, I P; CASADO, E L A; PINTO, P H *et al.* Eficacia de Tacrolimus tópico en el tratamiento del vitíligo. **Med Cutan Iber Lat Am.**, v. 33, n. 4, p. 33-34, 2005.

CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE. *Guide to the Care and Use of Experimental Animals.* **Ottawa:Canadian Council on Animal Care (CCAC)**, v.1. 1996.126p.

CASELE, H. L.; LAIFER, S. A. Pregnancy after liver transplantation. **Semin Perinatol**, v. 22, p.149-55, 2006.

CLIMAZ, R. *et al.* Alterations in the immune system of children from mothers treated with immunosuppressive agents during pregnancy. **Toxicol Lett**, v.149, p.155-62, 2004.

CUMMINGS, A. M. Toxicological mechanism of implantation failure. **Fundamental and applied toxicology**, v. 15, p. 571-579, 1990.

CHAHOUD, I. *et al.* Correlation between maternal toxicity and embryo/fetal effects. **Reprod Toxicol**, v.13, p.375-81, 1999.

CHRISTIAN, M.S. Test Methods for assessing female reproductive and developmental toxicology. In: HAYS, W. **Method of Toxicology**. Philadelphia: Taylor & Francis, 2001. p. 1301-81.

DRUML, W. The beginning of organ transplantation: Eimerich Ullmann (1861-1937). **Wen Klin Wochenschr.**, v. 114, n. 4, p. 128-137, 2002.

DUNN, C. *et al.* Cyclosporin: An updated review of pharmacokinetic properties, clinical efficacy and tolerability of a microemulsion-based formulation (Neoral®) in organ transplantation. **Drugs**, v. 61, n. 13, p. 1957-2016.

ETTENGER R; GRIMM E. Safety and efficacy of TOR inhibitors in pediatric renal transplant recipients. **Am J Kidney Dis.**, v. 38, n. 4, p. 22-28.

FRIEMANN, S. *et al.* Improvement of nephrotoxicity, hypertension, and lipid metabolism after conversion Kidney transplant recipients from cyclosporine to tacrolimus. **Transplant Proc**, v. 30, n. 4, p. 1240-2, 1998.

FUJIMURA A; EBIHARA A. Administration time-dependent toxicity of a new immunosuppressive agent, Tacrolimus (FK 506). **Life Sci**, v. 55, p. 485-90, 1994.

FURMAN, B. *et al.* Multiple pregnancies in women after renal transplantation case report that rises a management dilemma. **European journal of obstetrics & gynecology and reproductive biology**, v. 84, p. 107-110, 1999.

GARCIA S. C. *et al.* Cyclosporine A and Tacrolimus: a review. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.40, p.393–401, 2004.

GARCIA-DONAIRE, J.A. *et al.* Tacrolimus as basic immunosuppression in pregnancy after renal transplantation: a single center experience. **Transplant Proc**, v.37, p. 3754-5, 2005.

GEWIRTZ, A. T., SITARAMAN, S. V., Tacrolimus fujisawa. **Curr. Opin. Investig. Drugs**, v. 3, p.1307-1311, 2002.

GILBERT, M; LETURQUE, A. Fetal weight and its relationship to placental blood flow and placental weight in experimental intrauterine growth retardation in the rat. **J Dev Physiol**, v.4, p.237–46, 1982.

GOTO, T. *et al.* Discovery of FFK-506, a novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces tsukubaensis*. **Transplant Proc.**, v. 19, p.4-8, 1987.

GUTIERREZ, MJ *et al.* Pregnancy in renal transplant recipients. **Transplant Proc**, v. 37, p. 3721-3722, 2005.

HOMBO, T *et al.* The oral dosage form of FK506. **Transplant Proc**, v. 19, n.6, p. 17-22, 1987.

HONG, J.C.; KAHAN, B.D. Immunosuppressive agent in organ transplantation: past, present and future. **Semin. Nephrol.**, v. 20, p. 108-125, 2000.

HOOKS, M. A. Tacrolimus, a new immunosuppressant – a review of the literature. **The Annals of Pharmacology**, v. 28, p. 501-510, 1994.

JABIRY-ZIENIEWICZ, Z. *et al.* Outcome of four high-risk pregnancies in female liver transplant recipients on Tacrolimus immunosuppression. **Transplant Proc**, v.38, p.255-7, 2006.

JANEWAY, C. A. *et al.* **Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. 762p.

JONHSON, C. *et al.* Randomized trial of tacrolimus (Prograf) in combination with azathioprine or mycophenolate mofetil versus cyclosporine with micophenolate mofetil after cadaveric transplantation. **Transplant**, v. 69 p. 834, 2000.

KACZMAREK, I. *et al.* Impairment of the blood-brain barrier can result in tacrolimus-induced reversible leucoencephalopathy following heart transplantation. **Clin Transplant**, v. 17, n. 5, p. 469-72, 2003.

KAHAN, B. D.; RAJAGOPALAN, P. R.; Hali, M. For the United States Simulect Renal Study Group. Reduction of the occurrence of acute cellular rejection among renal allograft recipients treated with basiliximab, a chimeric anti-interleukin 2 receptor monoclonal antibody. **Transplant**, v. 67, p. 276, 1999.

KARI, J.A; TROMPETER, R.S. What is the calcineurin inhibitor of choice for pediatric renal transplantation? **Pediatr Transplant** , v.8, n.5, p.437-444, 2004.

KATO, H.; MORISHIGE, W. K.; ROTCHIL, D. I. A quantitative relationship between the experimentally determined number of conceptuses and corpus luteus activity in pregnant rat. **Endocrinology**; v. 105, p.846-850, 1979.

KELLER, K.A. Development and reproductive toxicology. In: KELLER, K.A.; JACOBSON-KRAM, D. (eds.). **Toxicological testing handbook**. 2nd ed. New York: Informa Healthcare, p.305-55, 2006.

KHERA, K.S. Maternal toxicity of drugs and metabolic disorders a possible etiologic factor in the intrauterine death and congenital malformation: a critique on human data. **CRC Crit Rev Toxicol**, v.17, p.345-75, 1987.

KHERA; K. S. Maternal toxicity: a possible etiological factor in embryo-fetal deaths and fetal malformations of rodent-rabbit species. **Teratology**, v.31, p.129-53, 1985.

KINDT, T. J.; GOLDSBY, R. A; OSBORNE, B. A. **Kuby Immunology**. 6<sup>th</sup> ed. W. H. Freeman and Company, 2006. 608p.

KINO, TH. *et al.* FK506, a novel Immunosuppressant isolated from streptomycetes. II. Immunosuppressive effect of FK506 in vitro. **J Antibiot.**, v. 40, p. 1256-1265, 1987.

KIRKMAN, R.L.; *et al.* A randomized prospective trial of anti-tac monoclonal antibody in human renal transplantation. **Transplantation**, v. 51, p.107, 1991.

KNOLL, G. A., BELL, R. C. Tacrolimus versus cyclosporine immunosuppression after cadaveric renal transplantation: meta analysis of randomised trials. **British medical journal**, v. 318, p. 1104, 1997.

KRENSKY, A. M.; STROM, T. B.; BLUESTONE, J. A. Imunomoduladores: Agentes imunossupressores, tolerógenos e imunoestimulantes. In: GILMAN, A. G. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003. p 11097–11115.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins and cotran pathologic basis of disease**. 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2004. 1525p.

LEMÔNICA, I.P. Embriofetotoxicidade. In: OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. São Paulo: Atheneu, p. 12-94, 1996.

LESSAN-PEZESHKI, M. Pregnancy after renal transplantations: points to consider. **Nephrol. Dial. Transplant**, v. 17, p. 703 -707, 2002.

MAGANHA, J.; PETERS, V.M., GUERRA, M.O. Fisiologia da implantação do blastocisto. **Bol. Centr. Biol. Reprod.**, v. 21, p. 5-24, 2002.

MANSON, J.M.; KANG, Y.J. Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology. In: HAYES, A.W. **Principle and methods of Toxicology**. 3<sup>rd</sup> ed. New York: Raven Press. chap. 28, p. 989-1035, 1994.

MAYER, A. D. Multicenter randomized trial comparing tacrolimus (FK506) and cyclosporine in the prevention of renal allograft rejection: a report of the European Tacrolimus Multicenter Renal Study Group. **Transplantation**, v. 64, p. 436-443, 1997.

McMILLAN, M. A. Clinical pharmacokinetics of cyclosporin. **Pharmac Ther**, v. 42, n. 1, p. 135-56, 1989.

MICHAL, F *et al.* Impact of the environment on reproductive health: executive summary. **Environmental Health Perspectives Supplements**, v. 101 (Suppl. 2), p. 159-167, 1993.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T.V.N. **Embriologia Básica**. Tradução por Maria das Graças Fernandes Sales *et al* .Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. 462p.

NEU, A. M. *et al*. Tacrolimus versus cyclosporine A as primery immunosuppression in pediatric renal transplantation: A NAPRTCS study. **Pediatr Transplant**, v. 7, p. 217 – 222, 2003.

OCHIAI, T *et al*. Studies of the induction and maintenance of long-term graft acceptance by treatment with FK506 in heterotopic cardiac allotransplantation in rats. **Transplantation**, v. 44, n. 6, p. 734-738, 1987.

O'NEILL, C. Autocrine mediators are required to act on the embryo by the 2-cell stage to promote normal development and survival of mouse preimplantation embryos in vitro. **Biol. Reprod.**, v. 58, p. 1303-1309, 1998.

OELLERICH, M. *et al*. Immunosuppressive drug monitoring of sirolimus and cyclosporine in pediatric patients. **Clin Biochem**, v.37, n.6, p. 424-428, 2004.

ORNOY A. *et al*. Placental findings in spontaneous abortions and stillbirths. **Teratology**, v.24, p.243–52, 1981.

PARR, M. B.; PARR, E. L. The implantation reaction. In: WYNN, R.M., JOLLIE, W.P. **Biology of the uterus**. 2<sup>nd</sup>. ed. New York: Plenum Medical Book Company, 1989. p. 233-277

PARSON, W. H.; NOLAN, H. S.; WIVRATT, M. J. Discovery of ciclosporin-A, FK-506, and rapamycin. **Ann NY Acad Sci.**, v. 685, p.22-36, 1993.

PIRSCH, J. D. *et al.* A comparison of tacrolimus (FK506) and cyclosporine for immunosuppression in cadaveric renal transplantation. FK506 kidney transplant study group. **Transplant**, v. 63, n. 7, p. 977-83, 1997.

PLATT, J. L.; RUBSTEIN, P. Mechanisms and characteristics of allograft rejection. In: SABINSTON, D. C. **Textbook of Surgery: The Biological Basis of Modern Surgical Practice**. 15 ed. Philadelphia: W. R. Saunders Company, 1997.

PLOSKER, G.L; FOSTER, R. H. Tacrolimus: a further update of its pharmacology and therapeutic use in the management of organ transplantation. **Drugs**, v. 59, p. 323-389, 2000.

ROUT, U.K.; ARMANT, D.R. Expression of genes for alcohol and aldehyde metabolizing enzymes in mouse oocytes and preimplantation embryos. **Reprod. Toxicol.**, v. 16, p. 253-258, 2002.

SANIN, L.H. *et al.* Relation between birth weight and placental weight. **Biol Neonate**, v.80, p.113–117, 2001.

SATCHELL, S. *et al.* Pregnancy, tacrolimus, and renal transplantation: survival of a 358 – g baby. **Nephrol Dial Transplant**, v.15, p.2065-2066, 2000.

SCOTT, L. *et al.* Tacrolimus: A further update of its use in the management of organ transplantation. **Drugs**, v. 63, n.12, p. 1247-1297, 2003.

SCHÜTZ, E. *et al.* Cyclosporine whole blood immunoassays (AXSYM, CEDIA, and Emit): a critical overview of performance characteristics and comparison with HPLC. **Clin Chem**, v. 44, n. 10, p. 2158-64, 1998.

SHAPIRO, R. Tacrolimus in pediatric renal transplantation: a review. **Pediatr. Transplant**, v. 2, p. 270-276, 1998.

SHAPIRO, S.; BROSS, D. Risk factors for fetal death in studies of vitalstatistic data interference and limitation. In: PROTER, I. H.; HOOK, E. B. **Human embryonic and fetal death**. New York: Academic Press, 1980. p. 89–127.

SOUZA, C. T. C. B. **Gravidez após transplante renal: impacto da gestação na função do enxerto e da imunossupressão sobre o feto**. São Paulo: UNIFESP/EPM. 2002, 70p. (Dissertação de Mestrado).

SOUZA, E. R.; GUERRA, M.O.; PETERS, V. M. Desenvolvimento de pré-embrião de ratas Wistar da colônia do biotério do Centro de Biologia da Reprodução – UFJF. **Bol. Centr. Biol. Reprod.**, v. 16, p. 63-70, 1997.

STEPKOWISKI, S. M. Molecular targets for existing and novel immunosuppressive drugs. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 2000, p. 1-23, 2000.

TANABE, K. Calcineurin inhibitors in renal transplantation. What is the best option? **Drugs**, v. 63, n.15, p.1535-1548, 2003.

TAYLOR, A. L.; WATSON, C. J. E.; BRADLEY, J. A. Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: mechanisms of action and therapeutic efficacy. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 56, p.23-46, 2005.

TERATOGENIC effects: Pregnancy category C. Disponível em: <  
<http://www.fda.gov/cder/foi/label/2003/507775CS006> protopic lb>. Acesso em: 12  
mar. 2005.

THOMPSON, A. M; BILLEWICZ, W. Z.; HYTTEN, F. E. The weight of placenta in relation to birthweight. **Brit J Obstet Gynaecol**, v.76, p. 865-872, 1969.

THOMSON, A. W. *et al.* Immunosuppressive activity of T-cell subset analysis, and acute toxicity of FK506 in rats. **Transplant . Proc.**, v.21, p.1048-1049, 1989.

TONG, T.Y. *et al.* Direct effects of varying doses of estradiol on early embryonic development in in vitro culture of rat's two-cell embryos. **Can J Physiol Pharmacol**, v.78, p.453-6, 2000.

TONSHOFF, B. The current status of mycophenolate mofetil in pediatric renal transplantation. **Pediatr Transplant**, v.3, p. 5-9, 1999.

TROMPETER, R. *et al.* Randomized trial of tacrolimus versus cyclosporin microemulsion in renal transplantation. **Pediatr Nephrol**, v. 17, p. 141-149, 2002.

TYL, R. W.; MARR, M.C. Development toxicity testing – Methodology. 2005. In: HOOD, R. D. (ed.). **Developmental and reproductive toxicology - a practical approach**. 2<sup>nd</sup>. ed. Londres: Taylor & Francis, 2006. p. 201-61.

UCHIDA, K. *et al.* Relationship between ovarian progesterin secretion and corpus lutea function in pregnant rat. **Endocrinol Jpn**, v.17, p.499-507, 1970.

UCHIDA, H. *et al.* Chronopharmacology of Tacrolimus in rats: toxicity and efficacy in mouse-to-rat intestinal transplant model and its pharmacokinetic profile. **Transplant Proc.**, v 31, n. 7, p. 2751-2753, 1999.

VENKATARAMANAN, R *et al.* Pharmacokinetics of fk506 following oral administration: a comparison of FK 506 and cyclosporine. **Transplant Proc**, v. 23, p. 931-933, 1991.

VICENTI, F.; JENSI KS, FILO R .A long-term comparison of tacrolimus (FK 506) and cyclosporine in kidney transplantation: evidence for improved allograft survival at five years. **Transplantation**, v. 73, p. 775, 2002.

VINCENTI, F. *et al.* Interleukin-2-Receptor blockade with daclizumab to prevent acute rejection in renal transplantation . **N Engl J Med**. v. 388, p. 161-165, 1998

WAYNNFORTH, H. B. Changes in the volume of rat corpus luteum during pregnancy and after surgical interference with the uterus and placenta. **Acta Endocrin**, v. 66, p. 296-302, 1971.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Principles for evaluating health risks to progeny associated with exposure to chemicals during pregnancy.** Geneva, 1984. (Environmental Health Criteria, 30).