

ALESSANDA FERNANDEZ LOUZADA
HOEGMANN RAMOS¹
JHENNIFER KLIECHEN RODRIGUES²
LORENA RIBEIRO DA SILVA²
MARTHA DE OLIVEIRA GUERRA³
VERA MARIA PETERS³

Desenvolvimento embrionário em ratas tratadas com tacrolimus durante a fase de pré-implantação

Embryo development in rats treated with tacrolimus during the preimplantation phase

Artigos originais

Palavras-chave

Tacrolimo/toxicidade
Tracolumo/administração & dosagem
Estruturas embrionárias/
efeitos de drogas
Imunossupressão
Blastocisto
Ratos Wistar

Keywords

Tacrolimus/toxicity
Tracolumus/administration & dosage
Embryonic structures/
drug effects
Immunosuppression
Blastocyst
Rats, Wistar

Resumo

OBJETIVO: avaliar a toxicidade do tacrolimus sobre o desenvolvimento embrionário em ratas tratadas durante o período de trânsito tubário. **MÉTODOS:** sessenta ratas Wistar foram distribuídas em quatro grupos (15 animais cada), que receberam diferentes doses de tacrolimus por via intragástrica: (T1) 1,0 mg/kg/dia, (T2) 2,0 mg/kg/dia e (T3) 4,0 mg/kg/dia. O grupo controle (C) recebeu água destilada. As ratas foram observadas diariamente para detectar sinais clínicos de toxicidade. O tratamento foi realizado do primeiro ao quinto dia de gestação. As seguintes variáveis maternas foram analisadas: peso corporal, de ovários, fígados e rins, consumo de alimento, número de corpos lúteos, implantes, fetos vivos e mortos e índice de implantação. Os fetos e placentas foram pesados e os primeiros foram observados para detectar malformações externas. Estatística: análise de variância (ANOVA), uma via, seguida de teste de Dunnett ($\alpha=0,05$). **RESULTADOS:** não ocorreram indícios clínicos de toxicidade materna, tais como perda de peso, redução do consumo de alimento ou do peso de órgãos ($p>0,05$). Também não houve diferença significativa no peso corporal dos fetos (C: $1,8\pm0,6$; T1: $2,2\pm0,5$; T2: $1,9\pm0,5$ e T3: $2,0\pm0,5$ g) e de placentas (C: $1,6\pm0,4$; T1: $1,5\pm0,4$; T2: $1,8\pm0,4$ e T3: $1,6\pm0,4$ g), com $p>0,05$. Nenhuma malformação externa foi detectada. **CONCLUSÕES:** a administração de tacrolimus a ratas prenhes durante o período de trânsito tubário não parece ter qualquer efeito tóxico e materno ou embrionário.

Abstract

PURPOSE: to evaluate the toxicity of tacrolimus on embryonic development in rats treated during the tubal transit period. **METHODS:** sixty Wistar rats were distributed into four groups (15 animals each), which received different doses of tacrolimus through intragastric administration: (T1) 1.0 mg/kg/day, (T2) 2.0 mg/kg/day and (T3) 4.0 mg/kg/day. The control group (C) received distilled water. The rats were observed daily to detect clinical signs of toxicity. The treatments were performed from the first to the fifth day of pregnancy. The following maternal variables were analyzed: body, ovary, liver, and kidney weights, food intake, number of corpora lutea, implants, alive and dead fetuses, and implantation rates. The fetuses and placentae were weighed and the former were observed in order to detect external malformation. Statistical analysis was performed by one way: analysis of variance (ANOVA), followed by the Dunnett test ($\alpha=0.05$). **RESULTS:** there were no signs of maternal toxicity, such as body weight loss, decrease in food intake or in organ weights ($p>0.05$). There was also no significant difference among weights of fetuses (C: 1.8 ± 0.6 ; T1: 2.2 ± 0.5 ; T2: 1.9 ± 0.5 and T3: 2.0 ± 0.5 g) and placentae (C: 1.6 ± 0.4 ; T1: 1.5 ± 0.4 ; T2: 1.8 ± 0.4 e T3: 1.6 ± 0.4 g), with $p>0.05$; no external malformation was detected in the fetuses. **CONCLUSIONS:** the administration of tacrolimus to pregnant rats during the tubal transit period does not seem to generate any toxic effect to mother or embryo.

Correspondência:

Vera Maria Peters
Rua São Mateus, 187, apto 1.404 – São Mateus
CEP 36025-001 – Juiz de Fora/MG
Fone: (32) 3229-3251/Fax: (32) 3229-3255
E-mail: peters.vera@ufjf.edu.br

Recebido

18/3/08

Aceito com modificações

9/5/08

Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF – Juiz de Fora (MG), Brasil.
Auxílio financeiro: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Cds 1840-06 E Rede 2824/05 E 2827/05.

¹ Pós-graduanda do Curso de Pós-graduação em Saúde Brasileira pela Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) – Juiz de Fora (MG), Brasil.

² Acadêmicas Estagiárias do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora –UFJF – Juiz de Fora (MG), Brasil.

³ Pesquisadoras do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora –UFJF – Juiz de Fora (MG), Brasil.

Introdução

Tacrolimus (FK 506, Prograf®) é um antibiótico macrolídeo que apresenta potente propriedade imunossupressora e seu uso clínico é crescente, sendo considerado o medicamento imunossupressor base em mais de 30% dos pacientes que receberam transplantes renais e mais de 80% dos transplantes hepáticos¹, sendo também utilizado em transplantes de ilhotas pancreáticas² e no tratamento de dermatite atópica e vitiligo³.

O tacrolimus atua inibindo a ativação das células T e bloqueando a calcineurina^{1,4}. Entre seus efeitos colaterais, observam-se insuficiência renal aguda e crônica, outras nefropatias e hipoglicemias⁵. É transferido por meio da placenta⁶ e seu uso durante a gravidez só é recomendado se o benefício para a mãe justificar o risco potencial ao feto.

As pacientes são aconselhadas a aguardar dois anos após o transplante para tentar a gestação, uma vez que as complicações são mais frequentes antes do segundo ano de transplante^{7,8}. Foram relatadas gestações em pacientes submetidas a transplante de fígado⁸ e em uso do tacrolimus, sendo a complicação mais frequente a prematuridade, observação compartilhada por outros autores^{7,9}. Estudos semelhantes em pacientes com transplante renal notaram a ocorrência de abortos espontâneos e gestações de prematuros¹⁰. Embora tenha sido descrito que a taxa de malformação não aumente em recém-nascidos de mães tratadas com tacrolimus^{7,11}, existe relato de 12% de abortos espontâneos em pacientes em uso do imunossupressor¹².

Os estudos sobre a toxicidade embrionária e fetal em animais de experimentação evidenciaram efeitos teratogênicos¹³. Em coelhos, induziu aumento do número de abortos (dose 1,0 a 3,2 mg/kg) e, em ratas tratadas durante o período de organogênese, causou aumento da toxicidade materna e de reabsorções tardias, decréscimo do número de nascimentos vivos e diminuição no peso e na viabilidade dos filhotes¹⁴.

Um dos mecanismos de ação do tacrolimus é a inibição da calcineurina¹⁵. A calcineurina é um regulador de íon cálcio e está envolvida com processos relacionados à secreção, citocinese, fusão de vacúolos e na integridade celular¹⁶. Por alterar proteínas cálcio-dependentes, o tacrolimus poderia potencialmente alterar ou inibir a expressão de caderinas, proteínas que têm papel crítico na regulação da morfogênese, dado seu envolvimento com a adesão, polarização e sinalização celular¹⁷. Essa proteína se expressa em concentrações progressivas desde a fase de duas células até blastocisto e tem papel chave na compactação dos blastômeros na fase de oito células¹⁸. Estes processos são essenciais no período inicial do desenvolvimento embrionário.

Os estudos em humanos referem-se a abortos¹², mas não às perdas pré-implantação que habitualmente não são detectadas. Muitas vezes, tais perdas são associadas à infertilidade e, na literatura consultada, não foram encontrados dados referentes a tais observações. Estudos em humanos, nessa fase, têm óbvias objeções morais, o que faz com que os animais de experimentação sejam utilizados para avaliação do risco potencial para o ser humano, razão que levou à realização do presente trabalho, que teve por objetivo verificar se a administração de tacrolimus na fase inicial da prenhez de ratas altera o desenvolvimento embrionário.

Métodos

Para a realização do experimento, foram utilizadas 60 ratas Wistar, nulíparas, com peso entre 190 e 230 g, obtidas do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora (CBR-UFJF).

As fêmeas foram inseminadas por machos de fertilidade previamente comprovada e a prenhez foi constatada pela presença de espermatozoides em esfregaço vaginal, realizado na manhã do dia seguinte ao acasalamento, sendo este dia considerado o primeiro dia pós-inseminação.

Os animais inseminados foram colocados isoladamente em gaiolas de polipropileno, forradas com maravalha selecionada e alojados em estantes climatizadas, em ambiente com luminosidade controlada para ciclos de claro/escuro de 12 horas, conforme descrito anteriormente. Receberam diariamente água filtrada *ad libitum* e 25 g/animal de ração peletizada (Nuvilab®)¹⁹.

As ratas foram distribuídas aleatoriamente em quatro grupos experimentais, com 15 animais em cada grupo. Os animais do grupo controle (C) receberam 1 mL de água destilada e os animais dos grupos tratados receberam tacrolimus (Prograf®, Janssen-Cilag Farmacêutica Ltda., lotes 5C51133A) nas doses de 1 mg/kg/dia (T1), 2 mg/kg/dia (T2) e 4 mg/kg/dia (T3) diluídos em água destilada. A menor dose foi a mesma utilizada por Ochiai et al.²⁰ para manutenção do transplante em ratos. A administração foi feita por via intragástrica duas vezes ao dia, com intervalo de 12 horas, desde o primeiro até ao quinto dia pós-inseminação.

Para observação de sinais clínicos indicativos de toxicidade materna²¹, as ratas foram observadas durante 30 minutos e seis horas após o tratamento e, posteriormente, uma vez ao dia. A toxicidade materna foi avaliada por presença de pêlos eriçados, hipotatividade ou hiperatividade no interior da gaiola, presença de sialorréia, diarreia ou mortes. O consumo de ração foi

estimado, conforme descrito anteriormente¹⁹, desde o primeiro até ao 15º dia pós-inseminação. O peso corporal materno foi anotado no primeiro e no último dia de tratamento e também no dia em que os animais foram sacrificados.

Os animais foram mortos no 15º dia pós-inseminação por exsanguinação sob anestesia (ketamina+xilazina, via intraperitoneal, 0,3 e 0,6 mL, respectivamente). O sangue colhido foi destinado a outro experimento.

Em cada animal, procedeu-se à observação de órgãos internos para identificação de lesões macroscópicas e à remoção e pesagem de fígado e rins maternos. Os ovários foram dissecados, pesados e neles contados os corpos lúteos. Os cornos uterinos foram seccionados longitudinalmente para identificação e contagem do número de implantes, de fetos vivos e mortos. Os fetos eram considerados vivos quando se identificaram batimentos cardíacos, observados sob estereomicroscópio. Foram anotados também pesos de placentas e de fetos por ninhada. Calculou-se a taxa de implantação: (número de implantes/número de corpos lúteos)x100 e a atividade antiimplantação²². Para análise de morfogênese, os fetos foram colocados em fixador de Bouin, durante 60 minutos, e depois foram examinados sob microscópio estereoscópico para identificação de malformações na face, nos membros e no fechamento do tubo neural.

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da UFJF (nº 035/2005).

Os dados contínuos, com distribuição normal e homocedasticidade da amostra, foram submetidos à análise estatística pelo testes de análise de variância (ANOVA), seguido de teste de Dunnett. Proporções foram avaliadas pelo χ^2 . O nível de significância admitido para os testes foi $\alpha=0,05$.

Resultados

Não foram encontrados indícios clínicos de toxicidade materna em nenhum dos grupos examinados. O consumo médio de ração (C: 16,6±1,6 g; T1: 16,8±0,9 g; T2: 18,3±1,7 g; T3: 17,9±1,8 g) apresentou diferença significativa ($p>0,05$) entre os grupos T2 e C, mas sem significado biológico.

Conforme mostrado na Tabela 1, foram encontrados, para os grupos C, T1, T2 e T3, respectivamente, os pesos médios: corporal (g): 204,9; 206,3; 210,4 e 210,2; de fígado (g): 9,2; 8,9; 9,2 e 9,2; de rins (g): 1,5; 1,5; 1,6 e 1,8; de ovários: 75,7; 110,1; 77,3 e 77,1; e médias de: corpos lúteos/mãe: 12,3; 12,1; 13,6 e 13,7; implantes/mãe: 11,7; 10,3; 12,0; 11,3; de fetos vivos/mãe: 10,4; 9,5; 11,1 e 10,5; taxa de implantação/grupo (%): 95,9; 86,3; 88,3 e 82,0, não havendo diferença significativa entre quaisquer das variáveis analisadas ($p>0,05$).

Os pesos corporais dos fetos e da placenta não diferiram entre os grupos ($p>0,05$), tendo sido observado para os Grupos C, T1, T2 e T3, respectivamente, médias de peso corporal (g) de 1,8; 2,2; 1,9 e 2,0 e de placenta (g) de 1,6; 1,5; 1,8 e 1,6.

Não foram detectadas alterações na morfogênese externa dos fetos em nenhum dos animais dos grupos estudados.

Discussão

Os estudos sobre toxicidade reprodutiva estão regulamentados por diversos órgãos, como Organization for Economic Co-operation and Development²³, guideline nº 421, e International Conference on Harmonisation²⁴, guideline S5, para teste de substâncias químicas.

Tabela 1 - Peso corporal e de órgãos maternos, número de corpos lúteos, de implantes e de fetos vivos em animais dos grupos controle e tratados com 1,0 mg/kg (T1), 2,0 mg/kg (T2) e 4,0 mg/kg (T3) de peso corporal desde o primeiro ao quinto dia de prenhez

Variáveis	Controle n=15		T1 n=15		T2 n=15		T3 n=15	
	Média	dp	Média	dp	Média	dp	Média	dp
Peso corporal (g)*	204,9	9,8	206,3	10,0	210,4	12,7	210,2	16,1
Fígado (g)	9,2	0,8	8,9	0,6	9,2	1,1	9,2	1,0
Rins (g)**	1,5	0,1	1,5	0,1	1,6	0,1	1,8	0,2
Ovários (mg)**	75,7	9,8	110,1	86,7	77,3	11,5	74,1	9,9
Corpos lúteos	12,3	1,4	12,1	1,8	13,6	1,7	13,7	2,2
Implantes	11,7	1,6	10,3	2,8	12,0	2,1	11,3	3,3
Taxa de implantação (%) ^a	95,9	9,7	86,3	22,2	88,3	11,1	82,0	20,2
Fetos vivos	10,4	0,6	9,5	2,7	11,1	2,3	10,5	2,9
Peso corporal do feto (g) ^b	1,8	0,6	2,2	0,5	1,9	0,5	2,0	0,5
Peso da placenta (g) ^b	1,6±0,4		1,5±0,4		1,8±0,4		1,6±0,4	

Resultados expressos em média e desvio padrão (dp).

*Peso corporal corrigido após remoção do útero e seu conteúdo; **peso do par de órgãos; ^a χ^2 ($p>0,05$), demais variáveis analisadas por ANOVA e teste de Dunnett ($p>0,05$); ^bobtido pela média do peso da ninhada.

Os protocolos indicam a necessidade de se distinguir entre toxicidade materna, que eventualmente possa interferir no desenvolvimento embrionário, e lesões diretas sobre o feto. Habitualmente, os indícios de toxicidade materna são a presença de perda de peso corporal, acompanhada ou não de redução do consumo de alimentos, os pêlos eriçados, além de alterações de peso de órgãos²⁵, fatores que não foram detectados entre os grupos estudados – o que sugere que o tacrolimus não teve efeito tóxico sobre o organismo materno.

A relação entre corpos lúteos e implantes permite calcular o índice de blastocistos implantados e os que não se implantaram; correspondem, portanto, às perdas pré-implantação²². Pelos resultados apresentados, as taxas de implantação foram semelhantes ($p > 0,05$) entre os grupos experimentais estudados e, conseqüentemente, as perdas pré-implantação também foram semelhantes. Tais dados permitem sugerir que o tacrolimus não causou perdas de embriões na fase de desenvolvimento nas tubas uterinas.

O tacrolimus não parece interferir na expressão de caderinas, essenciais na regulação da morfogênese e na compactação para formação da mórula¹⁷, já que não se

observaram perdas embrionárias, mortes pós-implantação que se refletissem no número de fetos vivos, na taxa de implantação e, tampouco, alterações da morfogênese externa. Não houve possibilidade de comparação de nossos resultados com outros autores, uma vez que, na literatura consultada, não foram encontrados estudos sobre o efeito do tacrolimus no início da prenhez de animais de experimentação.

Em conclusão, no modelo experimental utilizado no presente trabalho, o tacrolimus não causou toxicidade materna ou embrionária, quando administrado durante o período de pré-implantação.

Agradecimentos

Apoio financeiro: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), CDS 1840-06 e REDES 2824/05 e 2827/05.

As autoras agradecem ao doutor Carlos Alberto Mourão Júnior, pela análise estatística dos resultados; o apoio técnico dos bolsistas da Fapemig, Marcella Martins Terra, Maria das Graças Nascimento e Nádia Vieira Rangel; e às professoras Luciana Valente Borges e Rosana de Paiva Oliveira, pela leitura crítica do texto.

Referências

- Garcia SC, Lopes LC, Schott KL. Cyclosporine A and tacrolimus: a review. *J Bras Patol Med Lab.* 2004;40(6):393-401.
- Kaplan B, West P, Neeley H, Martello J, Iqbal R, Gangemi A, et al. Use of low dose tacrolimus, mycophenolate mofetil and maintenance IL-2 receptor blockade in an islet transplant recipient. *Clin Transplant.* 2008;22(2):250-3.
- Prats CI, López de ACE, Herranz PP, Arranz SDM, Corral CM, Casado JM. Eficacia de tacrolimus tópico en el tratamiento del vitiligo. *Med Cutan Iber Lat Am.* 2005;33(4):171-4.
- Taylor ALC, Watson CJ, Bradley JA. Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: Mechanisms of action and therapeutic efficacy. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2005;56(1):23-46.
- Flechner SM, Kobashigawa J, Klintmalm G. Calcineurin inhibitor-sparing regimens in solid organ transplantation: focus on improving renal function and nephrotoxicity. *Clin Transplant.* 2008;22(1):1-15.
- Satchell S, Moppett J, Quinn M, Nicholls A. Pregnancy, tacrolimus, and renal transplantation: survival of a 358-g baby. *Nephrol Dial Transplant.* 2000;15(12):2065-6.
- Danesi R, Del Tacca M. Teratogenesis and immunosuppressive treatment. *Transplant Proc.* 2004;36(3):705-7.
- Jabiry-Zieniewicz Z, Kamiński P, Pietrzak B, Cyganek A, Bobrowska K, Ziółkowski J, et al. Outcome of four high-risk pregnancies in female liver transplant recipients on tacrolimus immunosuppression. *Transplant Proc.* 2006;38(1):255-7.
- Christopher V, Al-Chalabi T, Richardson PD, Muiesan P, Rela M, Heaton ND, et al. Pregnancy outcome after liver transplantation: a single-center experience of 71 pregnancies in 45 recipients. *Liver Transpl.* 2006;12(7):1138-43.
- Gutiérrez MJ, Acebedo-Ribó M, García-Donaire JA, Manzanera MJ, Molina A, González E, et al. Pregnancy in renal transplant recipients. *Transplant Proc.* 2005;37(9):3721-2.
- Ducarme G, Théron-Gérard L, Duvoux C, Uzan M, Poncelet C. Pregnancy after liver transplantation with tacrolimus. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2007;133(2):249-50.
- Kainz A, Harabacz I, Colwick IS, Gadgil S, Hagiwara D. Analysis of 100 pregnancy outcomes in women treated systemically with tacrolimus. *Transpl Int.* 2000;13(Suppl 1):S299-00.
- Albengres E, LeLouet H, Tillement JP. Immunosuppressive drugs and pregnancy: experimental clinical data. *Transplant Proc.* 1997;29(5):2461-6.
- Gewirtz AT, Sitaraman SV. Tacrolimus fujiwara. *Curr Opin Investig Drugs.* 2002;3(9):1307-11.
- Plosker GL, Foster RH. Tacrolimus: a further update of its pharmacology and therapeutic use in the management of organ transplantation. *Drugs.* 2000;59(2):323-89.
- Kita A, Sugiura R, Shogi H, He Y, Deng L, Lu Y, et al. Loss of Apm1, the micro1 subunit of the clathrin-associated adaptor-protein-1 complex, causes distinct phenotypes and synthetic lethality with calcineurin deletion in fission yeast. *Mol Biol Cell.* 2004;15(6):2920-31.
- Alikani M. Epithelial cadherin distribution in abnormal human pre-implantation embryos. *Hum Reprod.* 2005;20(12):3369-75.
- Kawai Y, Yamaguchi T, Yoden T, Hanada M, Myake M. Effect of protein phosphatase inhibitors on the development of mouse embryos: protein phosphorylation is involved in the

- E-cadherin distribution in mouse two-cell embryos. *Biol Pharm Bull.* 2002;25(2):179-83.
19. Pinto RM, Fernandes ES, Reis JE, Peters VM, Guerra M de O. Intra-uterine growth retardation after prenatal administration of Ginkgo biloba to rats. *Reprod Toxicol.* 2007;23(4):480-5.
 20. Ochiai T, Nakajima K, Nagata M, Hori S, Asano T, Isono K. Studies of the induction and maintenance of a long-term graft acceptance by treatment with FK506 in heterotopic cardiac allotransplantation in rats. *Transplantation.* 1987;44(6):734-8.
 21. Nepomuceno F, Las Casas L, Peters VM, Guerra MO. Desenvolvimento embrionário em ratas tratadas com *Hipericum perforatum* durante o período de implantação. *Braz J Pharmacogn.* 2005;15(3):224-8.
 22. Nataraj SK, Puvvada PK, Badami S, Patil SB, Kannan E, Thillainayagam S, et al. Pre-coital and post-coital anti-implantation and abortifacient activities of *Aristolachia bracteolata* Lam. Aerial parts. *J Nat Med.* 2007;61(3):302-6.
 23. OECD. Guideline for the testing of chemicals – No. 414: Prenatal Developmental Toxicity Study. Paris: Organization for Economic Co-operation and Development; 2001.
 24. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonized Tripartite. Guideline S5(R2): Detection of Toxicity to Reproduction for Medicinal Products & Toxicity to Male Fertility [Internet]. 2005. [cited 2008 Jun 19]. p.14. Available from: <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA498.pdf>
 25. Yao M, Ritchie HE, Brown-Woodman PD. A developmental toxicity-screening test of valerian. *J Ethnopharmacol.* 2007; 113(2):204-9.