



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

Welma Emidio da Silva

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO METRONIDAZOL DURANTE A
PRENHEZ, SOBRE O DESENVOLVIMENTO PLACENTÁRIO E FETAL
DE RATAS ALBINAS**

RECIFE

2012

WELMA EMIDIO DA SILVA

**“EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO METRONIDAZOL DURANTE A
PRENHEZ, SOBRE O DESENVOLVIMENTO PLACENTÁRIO E FETAL
DE RATAS ALBINAS”**

**Dissertação apresentada ao Programa de
Biociência Animal da Universidade Federal
Rural de Pernambuco, como um dos pré-
requisitos para obtenção do grau de Mestre
em Biociência Animal. Área de
Morfofisiologia.**

Orientador:

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira

Co-orientadora:

Prof^a. Dr^a. Valéria Wanderley Teixeira

RECIFE

2012

WELMA EMIDIO DA SILVA

**“EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO METRONIDAZOL DURANTE A PREENHEZ,
SOBRE DESENVOLVIMENTO PLACENTÁRIO E FETAL DE RATAS ALBINAS”.**

Dissertação apresentada ao Programa de
Biotecnologia Animal da Universidade Federal
Rural de Pernambuco, como um dos pré-
requisitos para obtenção do grau de Mestre
em Biotecnologia Animal. Área de Morfofisiologia.

Aprovada em 16 de fevereiro de 2012.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira (Orientador) - UFRPE

Prof^a. Dr^a. Valéria Wanderley Teixeira - UFRPE

Prof. Dr. Fábio André Brayner dos Santos CPqAM - FIOCRUZ

Prof. Dr. Anísio Francisco Soares - UFRPE

“Dedico este trabalho ao meu grandioso Deus, que já me deu inúmeras provas de sua proteção e de sua constante presença em minha vida”.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, pela sua proteção, por ter me permitido chegar até aqui, pelas pessoas que colocou em meu caminho e por tudo que tem me oferecido e permitido conquistar.

Aos meus pais, Joel Cândido da Silva e Miriam Maria de Oliveira Silva, pelo amor, apoio, atenção e orientação, que me dedicaram e dedicam em todos os momentos de minha vida. Eles também me ensinaram que tudo que conseguimos nosso próprio esforço e com dignidade, são as coisas mais gratificantes e valiosas de nossa vida, sendo assim minhas fortalezas.

À minha irmã, Joelma Emidio da Silva, e ao meu cunhado, Gleiton Carlos Costa, pelo afeto, companheirismo e esforços que tanto ajudam em minha formação.

Ao meu noivo Adonias de Lima Ferreira, por todo amor, carinho, empenho, paciência e companheirismo dado em todos os momentos, principalmente nas horas mais difíceis. Também o agradeço por nunca ter ficado chateado por ter sido inúmeras vezes trocado por meus ratinhos ou até mesmo ter nossos assuntos pessoais interrompidos para me ouvir falar deles.

Ao meu orientador Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira pelos conhecimentos repassados, pela oportunidade de realizar este trabalho e pelo exemplo de profissional, que mim fez ter certeza da profissão que quero seguir. Pois a paciência e objetividade são as características que mais admiro.

Quero ressaltar infinitos agradecimentos a minha co-orientadora Prof^a. Dr^a. Valéria Wanderley Teixeira, pela oportunidade de realizar este trabalho, pelas lições repassadas, as quais me fizeram ver os caminhos corretos a seguir nessa profissão. Quero também agradecer-lá por me provar, mesmo sem perceber, que uma boa profissional pode ser também uma boa esposa e uma mãe presente e dedicada.

Aos professores Fabrício Bezerra de Sá e Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa, pelas dicas e sugestões de realização do teste TUNEL, para detecção de células em apoptose. Muito obrigada pela gentileza, paciência e dedicação ao nos ensinarmos a fazer essa imunohistoquímica.

Sou grata aos meus queridos amigos de laboratório: Alicely Araújo, Ana Janaina Jeanine Martins de Lemos, Ana Paula Castor Batista, Lílian Ribeiro, Carolline Guimarães D'Assunção, Hilda Michelly Paiva dos Santos, Fernanda Miguel de Andrade e Clovis José Cavalcanti Lapa Neto que, sem restrições, foram muito

solidários e companheiros sempre me ajudando no que eu precisava para a realização deste trabalho. Quero também agradecê-los por todos os momentos agradáveis e pela amizade adquirida em todo o período em que passei no laboratório de histologia, pois nos considero uma grande equipe.

Quero deixar meus sinceros agradecimentos a uma ex-companheira de laboratório, Ana Claudia Carvalho de Araújo, que tanto me ajudou e repassou conhecimentos, principalmente de técnicas de laboratório. Pois ela nunca mediu esforços para me ajudar, sendo sempre prestativa, solidária e acima de tudo amiga.

À Fernanda das Chagas Ângelo, não apenas por ser prestativa no laboratório, mas em todos os momentos que precisei. Pois desde que entrei no laboratório de histologia como estagiária ela foi uma verdadeira professora amiga. Mais uma vez sou grata por tudo.

Às queridíssimas amigas Ismaela Maria e Solange Bezerra por todas as alegrias, aflições e tristezas compartilhadas nesses dois anos, pois sempre se prontificaram a me ajudar. As agradeço também pela amizade, companheirismo e por transformar a convivência do dia-a-dia mais agradável. É difícil encontrar pessoas tão maravilhosas como vocês.

Aos queridos amigos Bruno Oliveira Ferreira de Souza e Fabiana Felix de Oliveira, por ajudar a utilizar o Kit para detecção de células em apoptose. Aprendi com vocês que é errando, voltando a errar e nunca desistindo é que se consegue. Vocês foram muito prestativos, mais uma vez foi muito bom contar com vocês e suas experiências.

Quero agradecer as minhas queridas amigas Daniela Fernandes de França, Iana Rafaela de Sá, Milene dos Santos e Rosilene Maria pela amizade, pelo carinho e por tudo que passamos juntas. Pois nem o tempo nem as diferenças de rumos tomados diminuíram nossa amizade, sendo nelas que encontro o conforto da amizade, fora da vida acadêmica.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro e por ter concedido a realização deste trabalho que tanto ajudou em minha formação profissional.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco pela oportunidade da realização do curso de Bacharelado em Ciências Biológicas e pós-graduação em biociência animal.

Ao Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco pelas instalações e pelos animais cedidos para a realização desse trabalho.

Recebam também meus agradecimentos, todos que diretamente ou indiretamente contribuíram em minha formação.

RESUMO

Vários autores relatam que o metronidazol atravessa a barreira placentária e penetra na circulação fetal, sendo ainda excretado no leite materno. Desta forma, não recomendam o uso dessa droga em mulheres gestantes e também a suspensão do aleitamento materno por 12 a 24 horas após a administração do mesmo. Entretanto alguns pesquisadores relatam faltar evidências de que o uso do metronidazol está associado com o aumento de riscos teratogênicos quando administrado durante a gestação sendo, portanto, desnecessário a espera do termino da gestação para o tratamento com essa droga. Assim, a presente pesquisa teve como objetivos analisar o efeito da administração do metronidazol durante a prenhez, sobre o desenvolvimento placentário e fetal de ratas albinas. Foram utilizadas 30 ratas albinas, que foram divididas em dois grupos. GRUPO I – ratas prenhas tratadas com placebo e GRUPO II – ratas prenhas tratadas com metronidazol. O metronidazol foi administrado por gavagem na dosagem diária de 130 mg/kg durante 7, 14 e 21 dias de gestação. Os resultados mostraram que no grupo tratado houve redução significativa do número de sítios de implantação, da área total do disco placentário e nos elementos constituintes das camadas do labirinto e trofospôncio. A análise histoquímica não revelou alterações significativas no teor de fibras colágenas, elásticas e reticulares. O teste de TUNEL mostrou atividade apoptótica nos sítios de implantação e placentas com 14 dias de desenvolvimento independente do tratamento. Não foram observados nenhum indício de malformação na cabeça, tronco e membros dos neonatos. No entanto, houve uma redução significativa no número e peso dos neonatos no grupo tratado com o metronidazol em relação ao controle. Assim, concluímos que o metronidazol administrado em ratas prenhas, por via oral, na dosagem de 130 mg/Kg, nos dois terços iniciais da gestação interfere na interação blastocisto endométrio, no desenvolvimento placentário e fetal, sugerindo que o uso desse medicamento deve ser evitado nas fases iniciais da gestação.

PALAVRAS-CHAVE: Metronidazol, prenhez, desenvolvimento placentário, desenvolvimento fetal

ABSTRACT

Several authors have reported that metronidazole crosses the placental barrier and enters the fetal circulation and is still excreted in breast milk. Thus, not recommend the use of this drug in pregnant women and also the breastfeeding suspension for 12-24 hours after administration. However, some investigators report lack of evidence that the use of metronidazole is associated with increased risk teratogenic when administered during pregnancy is therefore unnecessary waiting for the termination of pregnancy for treatment with this drug. Thus, this study aimed to analyze the effect of administration of metronidazole during pregnancy on placental and fetal development of albino rats. 30 albino rats were used, which were divided into two groups. GROUP I - pregnant rats treated with placebo and GRUPOII - pregnant rats treated with metronidazole. The metronidazole was administered daily by gavage at a dose of 130 mg / kg for 7, 14 and 21 days of gestation. The results showed that the treated group a significant reduction in the number of deployment sites, the total area of the placental disc and the constituents of the layers of the labyrinth and trofospôncio. The histochemical analysis revealed no significant changes in the content of collagen and elastic fibers and reticular. The test showed TUNEL apoptotic activity at the site of implantation and placental development 14 days regardless of treatment. We did not observe any evidence of malformation in the head, trunk and limbs of neonates. However, a significant reduction in weight and number of neonates in the group treated with metronidazole compared to control. Thus, we conclude that metronidazole in pregnant rats administered orally at a dosage of 130 mg / kg, in two thirds of early pregnancy interferes with the interaction blastocyst endometrium, in placental and fetal development, suggesting that this drug should be avoided in the early stages of pregnancy.

Key Words: Metronidazol, pregnancy, placental development, fetal development

SUMÁRIO

	Pág.
AGRADECIMENTOS.....	v
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
Capítulos	
I	
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1. Nitroimidazóis.....	13
2.2. Metronidazol.....	14
2.3. Indicações clínicas e dosificação do metronidazol.....	15
2.4. Desenvolvimento placentário.....	16
2.5. Uso de medicamentos na gestação.....	19
3. REFERÊNCIAS.....	21
II	
Efeito do metronidazol sobre a interação blastocisto-endométrio, desenvolvimento placentário e fetal em ratas albinas.....	30
RESUMO.....	31
1. INTRODUÇÃO.....	32
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3. RESULTADOS.....	37
4. DISCUSSÃO.....	39
5. REFERÊNCIAS.....	41
6. ANEXO	53

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

O metronidazol (1-(β -hidroxietil)-2-metil-5-nitroimidazol) é um agente sintético pertencente à classe dos nitroimidazois. Ele foi sintetizado na década de 1950 e introduzido inicialmente para o tratamento da tricomoníase, sendo posteriormente utilizado para tratamentos de infecções por outros protozoários e bactérias anaeróbias (BENDESKY; MENÉNDEZ, 2001; BRUNTON; LAZO; PARKER, 2006).

Essa substância foi o primeiro derivado 5-nitroimidazol introduzido na terapêutica humana e continua até hoje como o principal representante do grupo (TAVARES, 1999; BRUNTON; LAZO; PARKER, 2006). Atualmente, além de ser útil no tratamento de algumas infecções provocadas por diferentes tipos de parasitos, o mesmo, é um antibiótico com grande atividade bactericida frente a um grande número de bactérias anaeróbias, tanto gram-negativas como gram-positivas, e algumas microaerófilas (BENDESKY; MENÉNDEZ, 2001; BENDESKY; MENÉNDEZ; OSTROSKY-WEGMAN, 2002; SISSON et al., 2002; GARCIA; DÍAZ; BRUGUERAS, 2003; PÉREZ-TRALLERO; IGLESIAS, 2003; MIMS et al., 2005; KOROLKOVAS, 2007).

De acordo com Sisson et al. (2000) e Menéndez et al. (2001), o grande responsável pela atividade antiparasitária, antimicrobiana e mutagênica do metronidazol é seu grupo nitro (NO₂), que é quimicamente reduzido por proteínas do metabolismo anaeróbico, exclusivas de alguns parasitos, bactérias anaeróbias e de algumas microaerófilas, causando desestabilização da hélice de DNA, inibição da síntese de ácidos nucléicos e gerando compostos que são tóxicos para a célula (SAMUELSON, 1999; PÉREZ-TALLERO; IGLESIAS, 2003).

Estudos em linfócitos humanos mostraram um aumento significativo de quebras no DNA um dia após o término do tratamento com o metronidazol. Curiosamente, a quantidade de danos no DNA retornou aos níveis basais após 15 dias ao término do tratamento (MENÉNDEZ et al., 2001). Também foi observado um aumento significativo de anáfase anormal na cultura de linfócitos humanos e em ovário de hamster chinês (MUDRY et al., 1994; 1995).

Sabe-se que, nos mamíferos, o metronidazol se distribui amplamente pelo organismo, alcançando todos os tecidos e líquidos do corpo como a saliva, bile,

fígado, pulmões, líquido peritoneal, sêmen e secreções vaginais, quando administrado via oral ou intravenosa. Pela via oral, o metronidazol é absorvido rapidamente e sua biodisponibilidade é superior a 90%, com excelente penetração nos tecidos. Os alimentos não impedem sua absorção, porém retarda a mesma. A vida média é de 6 a 12 horas e as concentrações máximas se observam entre 1 e 2 horas depois de sua administração, sendo proporcionais a dosagem administrada (250mg, 500 mg ou 2 g via oral de metronidazol produzem concentrações séricas máximas de 6, 12 e 40 g/ml, respectivamente). Sua metabolização ocorre no fígado e sua eliminação é de 60-80% através da via renal e 6-15% pelas fezes (PÉREZ-TRALLERO; IGLESIAS, 2003; BLACK; ELLSWORTH, 2004).

Nos humanos, o metronidazol é uma droga formalmente usada em ginecologia e obstetrícia para o tratamento de infecções como a vaginite causada por *Trichomonas vaginalis* (PEIXOTO, 2007) e vaginose bacteriana (PAAVONEN et al., 2000; PEIXOTO, 2007), que são infecções que afetam milhões de mulheres em idade reprodutiva. Tanto a tricomoníase (KLEBANOFF et al., 2001) como a vaginose bacteriana (HILLER; HOLMES, 1999; FARO, 2000) tem sido associadas a várias complicações ginecológicas e obstétricas. Porém, apesar desta droga ter uso clínico por mais de três décadas, questões sobre a segurança do uso do metronidazol durante a gestação não tem sido bem esclarecidas.

Pesquisas mostraram que o metronidazol atravessa a barreira placentária e penetra na circulação fetal, sendo ainda excretado no leite materno (MURFY; JONES, 1994; PÉREZ-TRALLERO; IGLESIAS, 2003; BLACK; ELLSWORTH, 2004). Devido ao seu potencial de risco ainda desconhecido, o uso do metronidazol não é recomendado em mulheres gestantes (PÉREZ-TRALLERO; IGLESIAS, 2003; BLACK; ELLSWORTH, 2004). Também se recomenda a suspensão do aleitamento materno por 12 a 24 horas após a administração do mesmo (HOWARD; LAWRENCE, 1999).

Mudry et al. (2001) avaliando o potencial de danos reprodutivos do metronidazol em fêmeas de *Rattus norvegicus* relataram uma diminuição na viabilidade de embriões implantados. Esses autores, ainda reforçam que há uma necessidade de se realizar estudos de reprodução em modelos animais, para avaliar se os tratamentos com metronidazol não representam risco para a vida reprodutiva.

Em estudos toxicológicos de duração de 14 dias consecutivos, administrando-se metronidazol, por gavagem, na dose de 500mg/kg revelaram severos efeitos na fertilidade em ratos machos (EL-NAHAS; EL-ASHMAWY, 2004). Também foi observado anormalidades morfológicas em espermatozóides de ratos após o tratamento com o metronidazol na dosagem terapêutica de 130 mg/kg, por via intraperitoneal, sugerindo desta forma que essa droga tem um efeito genotóxico em células germinativas de ratos (MUDRY et al., 2007).

Um estudo epidemiológico controlado realizado por Kazy; Puhó; Czeizel (2005a) indicou uma possível associação entre o uso tópico do metronidazol vaginal durante a gravidez com a hidrocefalia congênita. No entanto, estes mesmos autores concordam que mais estudos são necessários para confirmar ou rejeitar esta conclusão. Em outra publicação esses mesmos autores observaram também que o risco de teratogênese aumenta seis vezes quando o metronidazol é associado ao miconazol tópico, principalmente o risco de polissindactilia (KAZY; PUHÓ; CZEIZEL, 2005b).

Em contra partida Diav-Citrin et al. (2001) relatou em seus estudos que a exposição ao metronidazol na gravidez não aumentou a taxa de anomalias quando usado nas doses recomendadas, porém foi observada uma redução do peso neonatal no grupo tratado com metronidazol comparados com os controles. Chin et al. (2001) relataram também que não há evidências documentadas que suportem a indicação ou oposição da suspensão do aleitamento materno após a utilização do metronidazol.

Diante do exposto, os dados obtidos da literatura provêm controvérsias e pouca certeza sobre a segurança do uso do metronidazol, quando administrada ao longo da gestação e lactação. Dessa forma, pesquisas são necessárias no sentido de esclarecer se o tratamento com o metronidazol exclui por completo resultados adversos inesperados, como anormalidades durante a gestação e ao nascimento. Portanto, a presente pesquisa teve o objetivo de analisar o efeito do metronidazol em ratas albinas durante a prenhez, sobre desenvolvimento placentário e fetal.

REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Nitroimidazóis

Os 5-nitroimidazóis apresentam uma estrutura heterocíclica consistindo de um núcleo imidazol com um grupo nitro, NO₂, na posição 5 (RAETHER; HÄNEL, 2003). Na indústria farmacêutica a produção de substâncias com atividade terapêutica envolve uma série de estratégias e conhecimentos da influência da introdução de grupamentos químicos específicos nas propriedades físico-químicas e eletrônicas da molécula e conseqüentemente em sua atividade biológica (WERMUTH, 2006).

O grupo nitro está presente em uma grande variedade de substâncias que apresentam atividade antimicrobiana e antiparasitária, como por exemplo: furazolidona, metronidazol, secnidazol, tinidazol, cloranfenicol, nitrofurantoína, nitrofurais, nitrofurazona, benznidazol, nifurtimox, como também em outras diversas classes terapêuticas como: ranitidina, nimesulida e clonazepam (BOSQUESI et al., 2008).

Durante os estudos de síntese, ficou evidenciado que a presença do grupo nitro na posição 5 do anel imidazólico era essencial para a atividade biológica. Alguns estudos ainda afirmam que a redução do grupo nitro é pré-requisito para a atividade biológica destes compostos (KEDDERIS; MIWA, 1988; EDWARDS, 1993). Segundo Güido et al. (2001), entre as várias substâncias químicas mutagênicas existentes, os nitrocompostos são considerados um dos grupos mais importantes devido ao grupo nitro presente na molécula.

A classe dos nitroimidazóis foi descoberta em 1955 após cientistas franceses do grupo Rhône-Poulenc descreveram a atividade de um extrato de *Streptomyces* 6670 contra *Trichomonas vaginalis*. Esse extrato já havia sido analisado em 1953 por Maeda e colaboradores e identificado como 2-nitroimidazol, também chamado de azomicina (BENDESKY; MENÉNDEZ, 2001; NIGRO; CARBALLO, 2008).

Com o isolamento da azomicina, gerou a síntese química e ensaios biológicos de diversos compostos nitroimidazólicos. Dentre estes, surge o metronidazol, de nome químico 1-(β-hidroxi-etil)-2-metil-5-nitroimidazol, o qual foi sintetizado em 1957 por Anon no laboratório Rhône-Poulenc, tendo-se descoberto sua atividade contra

Trichomonas spp (HARDMAN; LIMBIRD; GILMAN, 2001; NIGRO; CARBALLO, 2008), e contra *Entamoeba* na década de 60 (BRUNTON; LAZO; PARKER, 2006).

O metronidazol foi comercializado a partir de 1960 com o nome Flagyl, sendo o primeiro fármaco para o tratamento contra infecções por protozoários (BUSATTI, 2006). Devido ao seu sucesso, outros derivados 5-nitroimidazóis com estrutura química e atividade biológica semelhante foram desenvolvidos. O metronidazol e o ornidazol são os mais conhecidos, porém existem outros menos usados como o nimorazol, carnidazol, secnidazol e alguns de uso veterinário como dimetridazol, ipronidazol e ronidazol. Todos são derivados heterocíclicos com um núcleo de cinco átomos e um radical NO₂ (CUÉ; MOREJÓN, 1999; SALLES; SALLES, 2000; BRUNTON; LAZO; PARKER, 2006).

2.2. Metronidazol

O metronidazol é um dos medicamentos mais utilizados na prática médica, devido a seu grande espectro antimicrobiano, sendo, portanto, classificado como agente antiprotozoário e antibacteriano diverso (RANG; DALE; RITTER, 2001). Seu espectro de ação compreende protozoários, bactérias anaeróbias, tanto gram-negativas como gram-positivas e algumas microaerófilas. Dentre os anaeróbios incluem-se os bacteróides do grupo fragilis, *Fusobacterium spp.*, *Veillonella spp.*, e *Clostridium spp.* Entre as microaerófilas é muito ativo frente à *Gardnerella vaginalis* e *Helicobacter pylori*. A eficiência frente a protozoários inclui *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *T. vaginalis* e *Balantidium coli* (REBORA, 2002; PÉREZ-TRALLERO; IGLESIAS, 2003; BLACK; ELLSWORTH, 2004).

Organismos anaeróbios ou microaerofílicos susceptíveis ao metronidazol geram sua energia por meio da fermentação oxidativa de cetoácidos como o ácido pirúvico. A descarboxilação do piruvato catalisada por ferridoxina-piruvato oxidoreductase produz elétrons que reduzem a ferridoxina a qual cataliticamente doa seus elétrons para aceptores de elétrons biológicos ou ao metronidazol (SISSON et al., 2002; BRUNTON; LAZO; PARKER, 2006). A transferência de um único elétron forma um radical aniônico nitro (NO⁻) altamente reativo, o qual elimina os organismos susceptíveis por mecanismos de metilação direcionados ao DNA e possivelmente

outras biomoléculas vitais (BENDESKY; MENÉNDEZ; OSTROSKY-WEGMAN, 2002; SISSON et al., 2002; BRUNTON; LAZO; PARKER, 2006).

Com o aumento dos níveis de O₂, pode-se observar uma diminuição na citotoxicidade do metronidazol, devido ao O₂ competir com o fármaco pelos elétrons gerados no metabolismo energético dos organismos anaeróbios. Portanto, o O₂ é capaz de diminuir a citotoxicidade do metronidazol e de aumentar a reciclagem do fármaco ativado (BRUNTON; LAZO; PARKER, 2006). A ausência de proteínas transportadoras de elétrons, com suficiente potencial redox para reduzir o grupo nitro (NO₂) do metronidazol em células aeróbias torna o fármaco ineficiente para atuar contra as mesmas (LAND; JOHNSON, 1999; SISSON et al., 2002).

LaRusso et al. (1977) e Ludlum et al. (1988) relataram que este derivado nitroimidazol liga-se covalentemente com a guanina e citosina, produzindo quebra no DNA de diferentes espécies, incluindo humanos (EDWARDS, 1977; REITZ; RUMPF; KNITZA, 1991). Além disso, efeitos genotóxicos do metronidazol têm sido bem estudados em humanos e roedores sob diferentes aspectos, dentre estes a gestação. Entretanto, resultados controversos têm sido publicados (DOBIÁS et al., 1994; BENDESKY; MENÉNDEZ; OSTROSKY-WEGMAN, 2002).

2.3. Indicações clínicas e dosagem do metronidazol

O metronidazol é um dos mais efetivos antibióticos indicados para o tratamento de infecções anaeróbicas, giardíases, amebíases, incluindo infecções por *H. pylori* e por *E. histolytica* (PÉREZ-TRALLERO; IGLESIAS, 2003). Ele também é usado em ginecologia e obstetrícia para o tratamento de infecções parasitárias, como a vaginite causada por *T. vaginalis* e outras infecções, como vaginose bacteriana e infecções pélvicas mistas (PEIXOTO, 2007).

A dosagem habitual recomendada do metronidazol em adulto é de 500 mg a cada 12 horas, seja por via oral ou intravenosa. Porém, há mudanças em sua indicação que variam de 250 a 750 mg a cada 8 ou 12 h, respectivamente. Em crianças as doses oscilam entre 15 a 50 mg/kg/dia (sem superar os 750 mg/dia) tanto por via oral ou intravenosa (PÉREZ-TRALLERO; IGLESIAS, 2003).

Segundo Forna; Gulmezoglu (2003), o uso dos nitroimidazólicos é o tratamento mais recomendável e eficaz para a tricomoníase, apresentando uma taxa de cura de aproximadamente 90 a 95% com o uso do metronidazol. Ainda segundo Dubouchet et al. (1998) e Edwards (2004), recomenda-se o uso do metronidazol apenas por via oral porque a via tópica não elimina os *T. vaginalis* presentes nos ductos parauretrais, uretra e glândulas de Skene.

A tricomoníase apresenta uma ampla variedade de manifestações clínicas, desde quadro assintomático até severa vaginite e uretrite, afetando milhares de mulheres em idade reprodutiva (SCHEE et al., 1999; PAAVONEN et al., 2000; SAKRU et al., 2005). Além disso, ela tem sido associada a resultados adversos na gravidez, incluindo parto prematuro e baixo peso ao nascer (SCHEE et al., 1999).

Devido a segurança do uso do metronidazol durante a gestação não estar bem esclarecida, surge controvérsias na literatura quanto a recomendação do uso deste medicamento. Pérez-Trallero; Iglesias (2003) e Black; Ellsworth (2004) não recomendam o uso do metronidazol em mulheres gestantes. Porém, Peixoto (2007) preconiza o tratamento das gestantes sintomáticas com 2 g de metronidazol em dose única, por via oral, com o objetivo de melhora dos sintomas, prevenção da transmissão da infecção para o recém-nascido e para o parceiro, em qualquer trimestre da gestação. Pujol et al. (2003) não recomendam a dosagem única de 2 g durante o primeiro trimestre de gestação.

Para a vaginose bacteriana, há autores que alertam que o tratamento com metronidazol não deve ser postergado para após o término do primeiro trimestre, porque não há registro de efeitos teratogênicos ou mutagênicos em recém-nascidos (BURTIN, et al., 1995; CARO-PATON et al., 1997). Gilbert; Moellring; Sande (2000), recomendam o uso do metronidazol oral de 250 mg, três vezes ao dia, por sete dias durante gestação. PUJOL et al. (2003) fazem essa mesma recomendação, mas apenas para a partir do segundo trimestre da gestação.

2.4. Desenvolvimento placentário

A implantação embrionária é o processo pelo qual o blastocisto adquire uma posição estável no endométrio de modo a tornar possível a manutenção de um

eficiente sistema de trocas metabólicas e de informações entre o organismo materno e embrionário (RED-HORSE et al., 2004). Durante o processo de implantação também se inicia a diferenciação do trofoblasto, que culmina com a formação de diferentes tipos celulares, com diferentes potenciais funcionais e que juntos, posteriormente, vão compor a parte fetal da placenta (MÜNTENER; HSU, 1977; VERCRUYSSSE et al., 2006).

A placenta dos mamíferos é um órgão que tem como uma de suas funções principais, assegurar uma ótima nutrição em todas as fases do desenvolvimento fetal (GUDMUNDSSON; DUBIEL; SLADKEVICIUS, 2009; RIQUELME, 2009). Isto envolve a transmissão de nutrientes, gases e água para o feto, excreção de resíduos de produtos de metabolismo fetal no sangue materno, bem como a adaptação do metabolismo materno em diferentes fases da gestação por meio de hormônios (CETIN; ALVINO, 2009).

Durante a prenhez, as maiorias dos vertebrados vivíparos desenvolvem um sistema complexo de membranas nutricionais que envolvem o feto. No local de aposição ou de união das membranas fetais com a mucosa uterina é formada a placenta (LEISER; KAUFMANN, 1994). Até que a placenta se desenvolva totalmente, o embrião troca substâncias com o organismo materno por difusão através de líquidos uterinos. Conforme o embrião se desenvolve, a placenta torna-se essencial, uma vez que ela coloca o sangue fetal e o materno em estreita aposição numa grande extensão de superfícies formada por uma rede de capilares (CUNNINGHAM, 1999), devido a aposição de membranas fetais justapostas ou em fusão com a mucosa uterina, o que proporciona essa troca materno-fetal (BROLIO et al., 2010).

Quatro diferentes estruturas membranosas estão envolvidas no desenvolvimento placentário dos mamíferos eutérios, podendo haver ausência de algumas delas ou ainda junções entre uma ou mais membranas durante a gestação, ou desde o início dela; são elas: o cório, o âmnio, o saco vitelino e o saco alantoico. O cório é uma camada epitelial derivada do exterior da parede blastocística ou trofotoderma. Na maioria das espécies, o epitélio coriônico ou trofoblasto é a camada mais externa da unidade fetoplacentária e representa a barreira de troca decisiva entre os organismos materno e fetal (RIQUELME, 2009).

Em roedores e primatas, o âmnio é derivado do ectoderma embrionário formado por meio de divisão celular. Ele não desenvolve vasos atuando como uma membrana adicional. O saco vitelino se desenvolve a partir do endoderma e origina o chamado intestino primitivo embrionário. Ele consiste numa camada do epitélio endodérmico acompanhado por mesênquima fetal vascularizado. Em alguns mamíferos como os roedores, o saco vitelino substitui o cório localmente e, portanto, forma a membrana embrionária mais externa (LEISER; KAUFMANN, 1994).

O alantóide forma-se a partir de uma evaginação do teto do saco vitelínico, sendo revestido pela mesoderme extra-embrionária. Com o dobramento caudal do embrião ele passa a situar-se ventralmente, logo atrás do pedúnculo do saco vitelínico, onde sua parte intra-embrionária contribui para a formação da bexiga e do úraco (GARCIA; FERNÁNDEZ, 2001). Ainda segundo Leiser; Kaufmann (1994), o alantóide está pouco envolvido no processo de troca transplacentária.

De acordo com Cross; Mickelson (2006), o desenvolvimento da placenta é altamente regulamentado e também altamente adaptável. Na morfogênese, em particular das vilosidades, a área de superfície materno-fetal e a espessura da barreira através da qual passam os nutrientes pode ser alteradas. Além disso, a extensão da vascularização dentro das vilosidades é adaptável e pode ser comandada por expressão de células do trofoblasto de fatores angiogênicos. Além do desenvolvimento de estrutura básica, as funções da placenta são também altamente adaptáveis e podem mudar tanto em resposta ao ambiente materno ou defeitos dentro da placenta em si.

Em roedores, a placenta fetal apresenta duas regiões distintas: a zona juncional e a zona do labirinto. A zona juncional está localizada próxima à decídua materna e ambas as regiões possuem funções endócrinas e são normalmente irrigadas apenas pelo sangue materno (GIBORI, 1994; SOARES et al., 1996). A zona do labirinto recebe tanto sangue materno quanto sangue fetal, constituindo a principal região de trocas metabólicas da placenta (FERRO et al., 1999).

A placenta de roedores é classificada como hemocorial e as camadas trofoblásticas se organizam em três camadas (ENDERS; WELSH, 1993). Em ratos e camundongos estas camadas se organizam da seguinte maneira: Camada I, formada por células individualizadas onde estão em contato com o sangue materno. Algumas

dessas células são gigantes e apresentam funções endócrinas (SOARES et al., 1996). A camada II ou intermediária é formada por células sinciciais, apresentando função essencialmente endocítica (TAKATA; FUGIKURA; SHIN, 1997); a camada III, também sincicial, apresenta uma importante função seletiva por servir como barreira às macromoléculas (ENDERS et al., 1998). Junções comunicantes estão presentes entre as camadas trofoblásticas II e III (TAKATA; FUGIKURA; SHIN, 1997).

Mathias Duval foi um dos pioneiros na elucidação os aspectos histológicos da placenta desses animais, onde o mesmo subdivide o desenvolvimento placentário em três períodos: o período de formação da ectoplacenta, o que ocorre por volta do oitavo e décimo dia; o período de desenvolvimento da placenta, por fusão de membranas, compreendido entre o 11^o ao 17^o dia e por fim o período de maturação final da placenta, onde nos roedores isso ocorre por volta do 18^o ao 21^o dia de gestação (PIJNENBORG; VERCRUYSSSE, 2006).

Assim os roedores são animais frequentemente utilizados em experimentos reprodutivos devido ao conhecimento de suas estruturas bem como por apresentarem uma prenhez relativamente curta, ciclos estrais de curta duração e por ser animais de fácil manejo (PIJNENBORG; VERCRUYSSSE, 2006).

2.5. Uso de medicamentos na gestação

O uso de medicamentos na gestação merece especial atenção pelos riscos potenciais ao feto em desenvolvimento, devendo ser, por princípio, evitado (JONGVAN et al., 1993). Porém, quando inevitável seu uso, o médico deve informar ao paciente sobre os riscos inerentes a cada droga e, junto com a gestante, optar ou não por seu uso avaliando os riscos e os benefícios (STOCKTON; PALLER, 1990; REED, 1997).

Deve-se considerar que quando uma grávida ingere ou recebe qualquer medicamento, dois organismos serão afetados, sendo que o feto não tem a mesma capacidade de metabolizar as substâncias que a mãe, pois não possui os sistemas corporais plenamente desenvolvidos, estando, portanto, mais sujeito a efeitos negativos não esperados comumente chamados de teratogênicos (LAPORTE; TOGNONI; ROSENFELD, 1989).

O termo teratogênico refere-se especificamente aos defeitos de desenvolvimento induzido por exposições tóxicas que ocorrem entre a concepção e o nascimento (HODGSON et al., 2000; EATON; KLAASSEN, 2001; ROGERS; KAVLOCK, 2001). Ainda de acordo com Rogers; Kavlock (2001) e Panter (2002) as anomalias que são tipicamente associados com teratogênese incluem morte embrionária ou fetal, anormalidades morfológicas, funcionais, neurocomportamentais, redução da taxa de crescimento e peso ao nascer.

Os mecanismos de ação dos agentes teratogênicos ainda não estão completamente esclarecidos, sobretudo na espécie humana. Sabe-se, porém, que as drogas podem atingir os tecidos maternos e, indiretamente, o feto. Podendo ainda ter efeito direto sobre as células do embrião, resultando em anomalias específicas ou alterar a nutrição do feto, interferindo na passagem de nutrientes através da placenta (MACHADO, 1990).

O grau de teratogenicidade é amplamente influenciado pelo período de diferenciação do conceito, traduzido pela idade gestacional (STOCKTON, PALLER, 1990; WEISSBLUTH; BAKOS, 1992). O primeiro período corresponde ao intervalo entre a fertilização e implantação ou nidação, o qual corresponde na espécie humana a um período de 20 dias. A implantação é um fenômeno lábil, podendo ocorrer desprendimento do zigoto diante de um agente tóxico. O período seguinte é dito embrionário, indo do vigésimo ao quinquagésimo quinto dia. Essa é a fase de maior organogênese, sendo maior a susceptibilidade aos efeitos teratogênicos. O terceiro e último período é o fetal, do quinquagésimo quinto dia até o momento do parto. É quando há menor incidência de efeitos teratogênicos e de malformações congênitas associadas (MACHADO; RECH, 1986; STOCKTON; PALLER, 1990; WEISSBLUTH; BAKOS, 1992).

Estudos anteriores têm mostrado que devido à facilidade que o metronidazol tem de atravessar a barreira placentária, não se deve recomendar o tratamento com esse fármaco durante o primeiro trimestre de gestação, sob o risco de ocorrer teratogenicidades nos fetos (BURTIN et al., 1995; CARO-PATON, et al., 1997). No entanto, a literatura recente tem focado estudos apenas na investigação da interferência dessa substância no aparelho reprodutor masculino e feminino, sem, abordarem o desenvolvimento placentário durante o período gestacional (MUDRY et al., 2001; MUDRY et al., 2007; TIBONI; MAROTTA; CASTIGLIEGO, 2008).

Assim, em virtude das controvérsias relacionadas, principalmente, às dosagens e período que esta droga pode ser usada na gestação, torna-se necessário o desenvolvimento de pesquisas no sentido de esclarecer os possíveis efeitos adversos que o metronidazol pode trazer quando administrado durante a gravidez, ajudando a eliminar as dúvidas dos profissionais de saúde quanto a segurança da recomendação deste medicamento.

3. REFERÊNCIAS

BENDESKY, A.; MENÉNDEZ, D. Metronidazol: una visión integral. **Rev Fac Med UNAM**, v.44, n.6, p. 255-259, 2001.

BENDESKY, A.; MENÉNDEZ, D.; OSTROSKY-WEGMAN, P. Is metronidazole carcinogenic ? **Mutat Res**, v. 511, n. 2, p. 133–144, 2002.

BLACK, D. J.; ELLSWORTH, A. Practical overview of antibiotics for family physicians. **Clinical Family Practice**, v. 6, n. 1, p. 265-289, 2004.

BOSQUESI, P. L.; ALMEIDA, A. E.; BLAU, L.; MENEGON, R. F.; SANTOS, J. L.; CHUNG, M. C. Toxicidade de fármacos nitrofurânicos. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, v. 29, n.3, p. 231-238, 2008.

BROLIO, M. P.; AMBRÓSIO, C. E.; FRANCIOLLI, A. R.; MORINI, A. C.; GUERRA, R. R.; MIGLINO, M. A. A barreira placentária e sua função de transferência nutricional. **Rev Bras Reprod Anim**, Belo Horizonte, v. 34, n. 4, p. 222-232, 2010.

BRUNTON, L. L; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica**. 11 ed. Rio de Janeiro: McGaw-Hill, p. 9950 e 880, 2006.

BURTIN, P.; TADDIO, A.; ARIBURNU, O.; EINARSON, R. T.; KOREN, G. Safety of metronidazole in pregnancy: A meta-analysis. **Am J Obstet Gynecol** v. 172, n. 2, p. 525-529, 1995.

BUSATTI, H. G. N. O. **Investigação “in vitro” do potencial giardicida de quatro análogos do metronidazol**. Dissertação de Mestrado apresentada na Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brasil, 2006.

CARO-PATON, T.; CARVAJAL, A.; DIEGO, I. M.; MARTIN-ARIAS, L. H.; REQUEJO, A. A.; PINILLA, E. R. Is metronidazole teratogenic? A meta-analysis. **Br J Clin Pharmacol**, v. 44, n. 2, p. 179-82, 1997.

CETIN, I.; ALVINO, G. Intrauterine growth restriction: implications for placental metabolism and transport: A review. **Placenta**, v. 30, suppl. A, p. 77-82, 2009.

CHIN, K. G.; MCPHERSON, C. E.; HOFFMAN, M.; KUCHTA, A.; MACTAL-HAAF, C. Use of anti-infective agents during lactation: Part 2: Aminoglycosides, macrolides, quinolones, sulfonamides, trimethoprim, tetracyclines, chloramphenicol, clindamycin, and metronidazole. **J Hum Lact**, v. 17, n. 1, p. 54-65, 2001.

CROSS, J. C.; MICKELSON, L. Nutritional influences on implantation and placental development. **Nutr Rev**, v. 64, n.5, p. 12-18, 2006.

CUÉ, M.; MOREJÓN, M. Antibióticos de acción sistémica. Parte III: Sulfonamidas y tetraciclinas. **Rev Cubana Med Gen Integr**, v.15, n. 2, p.156-167, 1999.

CUNNINGHAM, J. G. **Tratado de fisiología veterinária**. 2.ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 528 p.1999.

DIAB-CITRIN, O.; SHECHTMAN, S.; GOTTEINER, T.; ARNON, J.; ORNOY, A. Pregnancy outcome after gestational exposure to metronidazole: a prospective controlled cohort study. **Teratology**, v. 63, n. 5, p. 186-192, 2001.

JONG-VAN, D. B. L. T. W.; WAARDENBURG, C. M.;, HAAIJER-RUSKAMP, F. M. DUKES, M. N. G.; WESSELING, H. Drug use in pregnancy: a comparative appraisal of data collecting methods. **Eur J Clin Pharmacol**, v.45, n. 1, p. 9-14, 1993.

DOBIÁS, L.; CERNÁ, M.; RÖSSNER, P.; SRÁM, R. Genotoxicity and carcinogenicity of metronidazole. **Mutat Res**, v. 317, n. 3, p. 177-194,1994.

DUBOUCHET, L.; MCGREGOR, J. A.; ISMAIL, M.; MCCORMACK, W. M. A pilot study of metronidazole vaginal gel versus oral metronidazole for the treatment of *Trichomonas vaginalis* vaginitis. **Sex Trans Dis**, v.25, p.176-179, 1998.

EATON, D. L.; KLAASSEN, C. D. **Principles of toxicology**. In: *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*. Klaassen CD (ed.). 6th edn, McGraw-Hill, New York, p. 11–34, 2001.

- EDWARDS, D. I. The action of metronidazole in DNA. **J Antimicrob Chemother**, v. 3, n.1, p. 43–48, 1977.
- EDWARDS, D. I. Nitroimidazoles drugs. Action and resistance mechanisms. I. Mechanism of action. **J Antimicrob Chemother**, v. 31, n. 1, p. 9–20. 1993.
- EDWARDS, L. Vaginitis and balanitis. *In*: EDWARDS L. **Genital dermatology atlas**. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, p.227, 2004.
- EL-NAHAS, A. F.; EL-ASHMAWY, I. M. Reproductive and Cytogenetic Toxicity of Metronidazole in Male Mice. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 94, n. 5, p. 226-231, 2004.
- ENDERS, A. C. A.; BLANKENSHIP, T. N.; LANTZ, K. C.; ENDERS, S. S. Morphological variation in the areas of chorioallantoic placentae: a review. **Placenta**, v. 19, n. 2, p. 1-19, 1998.
- ENDERS, E. A. C.; WELSH, A. O. Structural interactions of trophoblast and uterus during hemochorial placenta formation. **J Exp Zool**, v. 266, n.6, p. 578-587, 1993.
- FARO, S. Bacterial vaginosis: the quest continues. **Infect Dis Obstet Gynecol**, v. 8, n. 2, p. 75, 2000.
- FERRO, E. A. V.; BEVILACQUA, E. M. A. F.; FAVORETO-JUNIOR, S.; SILVA, D. A.; MORTARA, R.; MINEO, J. R. *Colomys callosus* (Rodentia, Cricetidae) trophoblast cells as host to *Toxoplasma gondii* in early pregnancy. **Parasitol Res**, v. 85, n. 8-9, p.647-654, 1999.
- FORNA, F.; GÜLMEZOGLU, A. M. Interventions for treating trichomoniasis in women. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 2, 2003.
- FREEMAN, C. D.; KLUTMAN, N. E.; LAMP, K. C. Metronidazole. A therapeutic review and update. **Drugs**, v. 54, n. 5, p. 679-708, 1997.
- GARCIA, M. M.; DÍAZ, R. S.; BRUGUERAS, M. C. Nuevos antimicrobianos. **Rev Cubana Farm**, v.37, n 2, p. 0-0, 2003.
- GARCIA, S. M. L.; FERNÁNDEZ, C. G. **Embriología**. 2. ed. Porto Alegre. Artmed, 416 p., 2011.
- GILBERT, D. N.; MOELLIRING, R. C.; SANDE, M. A. **The Sanford Guide to Antimicrobial Therapy**. 30 ed. Utah. Antimicrobial Therapy, Inc., 2000.

GIBORI, G. The decidual hormones end their role in pregnancy recognition. In: GLASSER, S. R.; MULHOLLAND, J.; PSYCHOYOS, A. **Endocrinology of embryo-endometrium interactions**. New York, plenum, p.217-222, 1994.

GUDMUNDSSON, S.; DUBIEL, M.; SLADKEVICIUS, P. Placental morphologic and functional imaging in high-risk pregnancies. **Semin Perinatol**, v. 33, n. 4, p.270-280, 2009.

GÜIDO, R. V. C.; FERREIRA, E. I.; NASSUTE, J. C.; VARANDA, E. A.; CHUNG, M. C. Diminuição da atividade mutagênica do pró-fármaco NFOH-121 em relação ao nitrofuril. **Rev Ciên Farm**, v. 22, n. 2, p. 319-333, 2001.

HARDMAN, J. G; LIMBIRD, L. E; GILMAN, A. G. **Goodman & ilman's:The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 10th ed. McGraw-Hill, New York, p. 1105-1107, 2001.

HILLER, S. L.; HOLMES, K. K. **Bacterial vaginosis. In sexually transmitted diseases**. 3 ed, Mc Graw-Hill. New York. p. 563-586, 1999.

HODGSON, E.; MAILMAN, R. B.; CHAMBERS, J. E.; DOW, R. E. **Dictionary of Toxicology**, 2 ed. Grove's Dictionaries Inc., New York, p. 1-504, 2000.

HOWARD, C. R.; LAWRENCE, R. A. Drugs and breastfeeding. **Clin. Perinatol**. v. 26, n. 2, p. 447-478, 1999.

KAZY, Z.; PUHO, E.; CZEIZEL A. E. Teratogenic potential of vaginal metronidazole treatment during pregnancy. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 123, n.2, p. 174-178, 2005a.

KAZY, Z.; PUHÓ, E.; CZEIZEL, A. E. The possible association between the combination of vaginal metronidazole and miconazole treatment and poly-syndactyly population-based case-control teratology study. **Reprod Toxicol**, v. 20, n. 1, p. 89-94, 2005b.

KEDDERIS, G. L.; MIWA, G. T. The metabolic activation of nitroheterocyclic therapeutic agents. **Drug Metab Rev**, v.19, n. 1, p. 33-62, 1988.

KLEBANOFF, M. A.; CAREY, J. C.; HAUTH, J. C.; HILLIER, S. L.; NUGENT, R. P.; THOM, E. A.; ERNEST, J. M.; HEINE, R. P.; WAPNER, R. J.; TROUT, W.; MOAWAD, A.; MODOVNIK, M.; SIBAI, B. M.; DORSTEN, J. P. V.; DOMBROWSKI, M. P.; O'SULLIVAN, M. J.; VARNER, M.; LANGER, O.; MCNELLIS, D.; ROBERTS, J. M;

LEVENO, K. J. Failure of metronidazole to prevent preterm delivery among pregnant women with asymptomatic *Trichomonas vaginalis* infection. **N Engl J Med**, v. 345, n. 7, p. 487-93, 2001.

KOROLKOVAS, A. **Dicionário Terapêutico Guanabara**. 14 ed. Guanabara Koogan. p. 644, 2007.

LAND, K. M.; JONSON, P. J. Molecular basis of metronidazole resistance in pathogenic bacteria and protozoa. **Drug Resist Updat**, v. 2, n.5, p.289-294, 1999.

LAPORTE, J. R.; TOGNONI, G.; ROZENFELD, S. **Epidemiologia do medicamento**. São Paulo/Rio de Janeiro: Hucitec/Abrasco, 1989.

LARUSSO, N. F.; TOMASZ, M.; KAPLAN, D.; MÜLLER, M. Absence of strand breaks in deoxyribonucleic acid treated with metronidazole. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 13, n. 1, p.19–24, 1977.

LEISER, R.; KAUFMANN, P. Placental structure: in a comparative aspect. **Exp Clin Endocrinol**, v. 102, n. 3, p. 122-134, 1994.

LUDLUM, D. B.; COLINAS, R. J.; KIRK, M. C.; MEHTA, J. R. Reaction of reduced Metronidazole with guanosine to form an unstable adduct. **Carcinogenesis**. v. 9, n. 4, p. 593-596, 1988.

MACHADO, A. R. L.; RECH, J. R. Drogas na gestação. **Rev HCPA & UFRS**, v. 6, n. 2, p. 81-90, 1986.

MACHADO, M. A. P. Seguridad y riesgo de los medicamentos en el embarazo y la lactancia. **Rev Cuba Obstet Ginecol**, v.16, n. 2, p. 127-147, 1990.

MENÉNDEZ, D.; ROJAS, E.; HERRERA, L. A.; LÓPEZ, M. C.; SORDO, M.; ELIZONDO, G.; OSTROSKY-WEGMAN, P. DNA breakage due to metronidazole treatment. **Mutat Res**, v. 478, n. 1-2, p. 153–158, 2001.

MIMS, C.; DOCKRELL, H. M.; GOERING, R. V.; ROITT, I.; WAKELIN, D.; ZUCKERMAN, M. **Microbiologia Médica**. 3 ed. Rio de Janeiro: ELSEVIER, p. 212 e 315, 2005.

MUDRY, M. D.; CARBALLO, M.; VINUESA, M. L.; GONZALEZ, M.; LARRIPA, I. Mutagenic bioassay of certain pharmacological drugs: III Metronidazole (MTZ). **Mutat Res**, v. 305, N. 2, p. 127–132, 1994.

- MUDRY, M. D.; GADANO, A.; GONZALEZ, M.; CARBALLO, M. Mutagenesis química. Riesgo y beneficio en el consumo de antiparasitarios. **Interciencia**, v. 20, n. 4, p. 204-211, 1995.
- MUDRY, M. D.; MARTINEZ-FLORES, I.; PALERMO, A. M.; CARBALLO, M. A. EGOZCUE, J.; CALDES, M. G. Embryo lethality induced by metronidazole (MTZ) in *Rattus norvegicus*. **Teratog. Carcinog. Mutagen**, v. 21, n.3, p. 197-205, 2001.
- MUDRY, M. D.; PALERMO, A. M.; MERANI, M. S.; CARBALLO, M. A. Metronidazole-induced alterations in murine spermatozoa morphology. **Reprod Toxicol**, v. 23, n. 2, p. 246 – 252, 2007.
- MÜNTENER, M.; HSU, Y. Development of trophoblast and placenta of the mouse. **Acta Anat**, v.98, n. 3, p. 241- 252, 1977.
- MURPHY, P. A.; JONES, E. Use of oral metronidazole in pregnancy: risks, benefits, and practice guidelines. **J Nurse Midwifery**, v. 39, n. 4, p. 214-220, 1994.
- NIGRO, M. M. L.; CARBALLO, M. A. Los nitroimidazoles como modelo de mutagénesis química y muerte celular. **Theoria**, v. 17, n. 2, p. 47-62, 2008.
- PAAVONEN, J.; MANGIONI, C.; MARTIN, M. A.; WAJSZCZUK, C. P. Vaginal clindamycin and oral metronidazole for bacterial vaginosis: a randomized trial. **Obstet Gynecol**, v. 96, n. 2, p. 256-260, 2000.
- PANTER, K. E. Plant and chemical teratogens. In: **Proceedings of Annual Conference of the Society for Teriogenology and American College of Teriogenologists**. Colorado Springs, p. 463-472, 2002.
- PEIXOTO, F. C. **Avaliação da eficácia e tolerabilidade do uso de óvulos vaginais contendo metronidazol e nitrato de miconazol no tratamento de vaginites**. Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.
- PÉREZ-TRALLERO, L.; IGLESIAS, L. Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v. 21, n. 9, p. 520-529, 2003.
- PIJNENBORG, R.; VERCRUYSSSE, L. Mathias Duaval on placental development in mice and rats. **Placenta**, v. 27, n. 2-3, p. 109-118, 2006.

PUJOL, M. C.; SANTIESTEBAN, E. F.; HERRERA, L. S.; FABIÁN, E. V.; LEÓN, E. C.; BLANCO, M. O.; SOBERAT, F. S.; MARTÍNEZ, W. F.; ABREU, M. I. L. Guía para la práctica clínica de las infecciones vaginales. **Rev Cubana Farm**, v. 37, n. 1, p.38-52, 2003.

RAETHER, W.; HÄNEL, H. Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. **Parasitol Res**, v. 90, n. 1, p. 19-39, 2003.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 4 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 310-663. 2001.

REBORA, A. The management of rosacea. **Am J Clin Dermatol**, v. 3, n.7, p. 489-496, 2002.

REED, B. R. Dermatologic drugs, pregnancy and lactation: a conservative guide. **Arch Dermatol**, v. 133, n. 7, p. 894-898, 1997.

RED-HORSE, K.; ZHOU, Y.; GENBACEV, O.; PRAKOBPHOL, A.; FOULK, R.; MCMASTER, M.; FISHER, S. J. Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. **J Clin Invest**, v. 114, n. 6, p.744-754, 2004.

RIQUELME, G. Placental chloride channels: a review. **Placenta**, v.30,n. 8, p. 659-669, 2009.

REITZ, M., RUMPF, M., KNITZA, R. DNA single strand breaks in lymphocytes after metronidazole therapy. **Arzneimittelforschung**, v. 41, n. 2, p.155–156, 1991.

ROGERS, J. M.; KAVLOCK, R. J. Developmental toxicology. In Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, 6th edn, Klaassen CD (ed.). McGraw-Hill, New York, p. 351–86, 2001.

SAKRU, N.; TOZ, S. O.; YETKIN, A. C.; AKINCI, P. Y.; KIRCA, U. Increased sensitivity of *Trichomonas vaginalis* isolation from vaginal secretions by subsequent blind passage of preliminary negative cultures. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 52, n. 1, p. 75-76, 2005.

SALLES, J. M.; SALLES, M. J. C. **Antimicrobianos: quando indicar, como usar**. Belém, editora da UFPA, 518 p., 2000.

SAMUELSON, J. Why metronidazole is active against both bacteria and parasites. *Antimicrob. Agents Chemother*, v. 43, n. 7, p. 1533-1541, 1999.

SCHEE, C. V. D.; BELKUM, A. V.; ZWIJGERS, L.; BRUGGE, E. V. D.; O'NEILL, E. L.; LUIJENDIJK, A. D.; RIJSOORT-VOS, T. V.; MEIJDEN, W. I. V. D.; VERBRUGH, H. SLUITERS, H. J. F. Improved Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* Infection by PCR Using Vaginal Swabs and Urine Specimens Compared to Diagnosis by Wet Mount Microscopy, Culture, and Fluorescent Staining **J Clin Microbiol**, v. 37, n. 12, p. 4127-4130, 1999.

SISSON, G.; JEONG, J.; GOODWIN, A.; BRYDEN, L.; ROSSLER, N.; LIM-MORRISON, S.; RAUDONIKIENE, A.; BERG, D. E.; HOFFMAN, P. S. Metronidazole activation is mutagenic and causes DNA fragmentation in *Helicobacter pylori* and in *Escherichia coli* containing a cloned H. pylori RdxA(+) (Nitroreductase) gene. **J. Bacteriol**, v. 182, n.18, p. 5091-5096, 2000.

SISSON, G.; GOODWIN, A.; RAUDONIKIENE, A.; HUGHES, N. J.; MUKHOPADHYAY, A. K.; BERG, D. E.; HOFFMAN, P. S. Enzymes associated with reductive activation and action of nitazoxanide, nitrofurans, and metronidazole in *Helicobacter pylori*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, n. 7, p. 2116-2123, 2002.

SOARES, M. J.; CHAPMAN, B. M.; RASMUSSEN, C.A.; KAMEI, T. Differentiation of trophoblast endocrine cells. **Placenta**, v 15, n 5-6, p. 287-289,1996.

STOCKTON, D. L.; PALLER, A. S. Drug administration to the pregnancy or lactating woman: a reference guide for dermatologists. **J Am Acad Dermatol**, v. 23, n. 1, p. 87-103. 1990.

TAKATA, K.; FUJIKURA, K.; SHIN, B. C. Ultrastructure of rodent placental labyrinth: a site of barrier and transport. **J Rep Development**, v. 43, n. 1, p. 1-17, 1997.

TAVARES, W. **Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfeciosos**. 2 ed. São Paulo. Atheneu, p. 586-588, 1999.

TIBONI, G. M.; MAROTA, F.; CASTIGLIEGO, A. P. Teratogenic effects in mouse fetuses subjected to the concurrent *in utero* exposure to miconazole and metronidazole. **Reprod Toxicol**, v. 26, n. 3-4, p. 254-261, 2008.

VERKRUYSSSE, L.; CALUWAERTS, S.; LUYTEN. C.; PIJNENBORG, R. Interstitial trophoblast invasion in the deciduas and mesometrial triangle during the last third of pregnancy in the rat. **Placenta**, v. 27, n. 1, p.22-33, 2006.

WEISSBLUTH, M. L.; BAKOS, L. Terapêutica dermatológica sistêmica e tópica na gravidez e lactação: o que pode ser usado? **An Bras Dermatol**, v.67, n.5, p. 211-216, 1992.

WERMUTH, C. G. **Strategies in the search for new lead compounds or original working hypotheses**. In: Wermuth CG, editor. The practice of medicinal chemistry. London: Academic. p.81, 2006.

CAPÍTULO II

Efeito do metronidazol sobre a interação blastocisto-endométrio, desenvolvimento placentário e fetal em ratas albinas

Silva, W. E.^a; Melo, I. M. F.^a; Teixeira, A. A. C.^{a*}; Wanderley-Teixeira, V.^a

^a Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil

*Autor para correspondência: UFRPE-DMFA. Av. Dom Manoel de Medeiros s/n Dois Irmãos- Recife-PE-Brazil. CEP 52171-900. Tel. +55 81 33206389
E-mail: alvaro@dmfa.ufrpe.br (Teixeira A.A.C.)

Resumo

O metronidazol é um antiprotozoário e antibacteriano usado em ginecologia e obstetrícia para o tratamento de infecções parasitárias. Porém, apesar de ter uso clínico por mais de três décadas, questões sobre a segurança do seu uso durante a gestação não está bem esclarecida. Assim, a presente pesquisa avaliou o efeito do metronidazol sobre a interação blastocisto-endométrio e sobre o desenvolvimento placentário e fetal em ratas prenhes. O metronidazol foi administrado por gavagem na dosagem de 130 mg/Kg, por sete e 14 dias. Realizou-se análise morfológica, morfometria e imunohistoquímica nos sítios de implantação e nas placentas com 14 dias de desenvolvimento. Os resultados mostraram que no grupo tratado houve redução significativa do número de sítios de implantação, da área total do disco placentário e nos elementos constituintes das camadas do labirinto e trofospôncio. A análise histoquímica não revelou alterações significativas no teor de fibras colágenas, elásticas e reticulares. O teste de TUNEL mostrou atividade apoptótica nos sítios de implantação e placentas com 14 dias de desenvolvimento independente do tratamento. Não foram observados nenhum indício de malformação na cabeça, tronco e membros dos neonatos. No entanto, houve uma redução significativa no número e peso dos neonatos no grupo tratado com o metronidazol em relação ao controle. Assim, concluímos que o metronidazol administrado em ratas prenhes, por via oral, na dosagem de 130 mg/Kg, nos dois terços iniciais da gestação interfere na interação blastocisto endométrio e desenvolvimento fetal, sugerindo que o uso desse medicamento deve ser evitado nas fases iniciais da gestação.

Palavras-chave: metronidazol, prenhez, desenvolvimento placentário, reprodução.

1. Introdução

O metronidazol é um agente sintético antiprotozoário e antibacteriano diverso pertencente a classe dos nitroimidazóis, e cujo uso na prática clínica já se faz há mais de 35 anos [1]. Esse medicamento é formalmente usado em Ginecologia e Obstetrícia para o tratamento de infecções parasitárias, como a vaginite causada por *Trichomonas vaginalis* e outras infecções, como vaginose bacteriana e infecções pélvicas mistas [2,3]. Porém, apesar desta droga ter uso clínico por mais de três décadas, questões sobre a segurança do uso do metronidazol durante a gestação não tem sido bem esclarecidas.

Devido ao seu potencial de risco ainda desconhecido, a Food and Drug Administration classificou o metronidazol como um medicamento de fator de risco de classe B para a gravidez, mas que apresenta possíveis riscos não confirmados para o feto. Portanto, a droga foi contraindicada no primeiro trimestre de gestação e é considerada como terapia de segunda linha no final da gestação [4,5]. Sabe-se ainda que o uso de metronidazol atravessa a barreira placentária e penetra na circulação fetal [4,6]. No entanto, há conflitos entre pesquisadores com relação a segurança do uso do metronidazol na gestação.

Struthers; Sear; Skobie [7] afirmam que as literaturas publicadas sobre o uso de metronidazol em mulheres grávidas indicam que ele não é teratogênico, independentemente do trimestre em que é usado. Entretanto, pesquisas realizadas com a administração desse medicamento indicaram danos reprodutivos em ratos [8,9]. Kazy; Puhó; Czeizel [10] indicou uma possível associação entre o metronidazol vaginal, utilizado durante a gravidez, e hidrocefalia congênita. Assim, diante do exposto e dos dados obtidos da literatura, torna-se necessário pesquisas que esclareçam os possíveis riscos da administração desta droga durante a gestação. Portanto, a presente pesquisa teve o objetivo de analisar o efeito da ação do metronidazol durante a prenhez, sobre desenvolvimento placentário e fetal em ratas albinas.

2. Material e métodos

2.1 Animais e grupos experimentais

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Histologia da UFRPE, o qual foi submetido ao Comitê de Ética para aprovação pelo processo de seguinte número: 23082.010870/2010. Para isso, foram utilizadas 30 ratas albinas (*Rattus norvegicus albinus*) adultas, com 90 dias de idade, virgens, pesando aproximadamente 200g, da linhagem Wistar, procedentes do Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Os animais foram confinados em gaiolas e mantidos com alimentação e água ad libitum, em temperatura ambiente de 22°C ±2 com iluminação artificial produzida por lâmpadas fluorescentes (marca Phillips, modelo luz do dia, 40 W), que estabeleceu o fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro, considerando o período de luz das 6:00 às 18:00 horas.

Após um período de adaptação, foram colhidos esfregaços vaginais para a determinação do ciclo estral. As fêmeas que apresentaram três ciclos estrais regulares foram distribuídas ao acaso, em dois grupos, cada um constituído por 15 animais a saber: Grupo I - ratas prenhes tratadas com placebo, e Grupo II - ratas prenhes tratadas com metronidazol. As fêmeas foram acasaladas na proporção de um macho para duas fêmeas, sempre no início da noite (18:00h). Na manhã (06:00h) do dia seguinte, foram realizados exames colpocitológicos para a confirmação do acasalamento, tomando-se com parâmetro a presença de espermatozoides nos esfregaços.

2.2. Exame colpocitológico

Para a coleta do material foram utilizadas hastes de algodão umedecidas em solução salina, as quais foram introduzidas na vagina produzindo-se um movimento rotatório. Em

seguida, o material coletado foi transferido para lâminas histológicas através de um movimento rotatório da haste sobre as lâminas. Essas lâminas foram imediatamente mergulhadas numa mistura de álcool-éter, em partes iguais, para fixação e, a seguir, foram coradas pelo método Shorr-Harris.

2.3. Tratamento com metronidazol

O metronidazol foi administrado por via oral (gavagem), a partir da confirmação do acasalamento, na dosagem diária de 130 mg/Kg em 0,5mL de solução fisiológica, por sete e 14 dias. A dosagem foi estabelecida segundo Mudry et al. [9], com alteração apenas na via de administração. O grupo I recebeu apenas 0,5mL de solução fisiológica pela mesma via.

2.4. Análise morfológica

2.4.1. Número de sítios implantados e análise das placentas

Cinco fêmeas dos grupos I e II foram eutanasiadas no sétimo e décimo quarto dia de prenhez, para análise dos sítios de implantação e das placentas, respectivamente. Para tanto, as fêmeas foram anestesiadas com hidrocloridrato de cetamina (80mg/kg) e xilazina (6mg/kg), por via intramuscular [11]. A seguir, foi realizada a abertura da cavidade abdominal desde o púbis até o rebordo das costelas; procedendo-se em seguida a disjunção da sínfise púbica, para facilitar a remoção total do útero. Foram, então, retirados os cornos uterinos contendo sítios de implantação e placentas, os quais foram mergulhados imediatamente em líquido de Bouin, permanecendo no mesmo por 48 horas. Em seguida foi feito o aprofundamento da anestesia até a dose letal. Ao final do tempo de fixação os cornos uterinos foram colocados, um por um, em uma placa de Petri e levados a uma lupa para contagem dos sítios de implantações (utilizando-se como referência às áreas dilatadas apresentadas pelos mesmos) e retirada das placentas.

Após esses procedimentos, os sítios de implantação e as placentas foram clivados transversalmente e longitudinalmente, obtendo-se fragmentos, as quais foram desidratadas em álcool etílico (concentrações crescentes), diafanizados pelo xilol, impregnados e incluídos pelo “paraplast”. Em seguida, os blocos foram cortados em micrótomo do tipo Minot (Leica RM 2035) ajustado para 5 µm. Os cortes assim obtidos foram colocados em lâminas previamente untadas com albumina de Mayer e mantidos em estufa regulada à temperatura de 37°C, durante 24 horas, para secagem e colagem. Em sequência, os cortes foram submetidos à técnica de coloração pela hematoxilina - eosina (H. E.), Tricrômico de Mallory, Orceína nítrica e Impregnação argêntica, e analisados em microscópio de luz, da marca OLYMPUS BX-49 e fotografados em fotomicroscópio OLYMPUS BX-50.

2.4.2. Contagem do número, aferição do peso e comprimento dos neonatos

As cinco fêmeas restantes de cada grupo foram acompanhadas durante toda a gestação até o nascimento dos filhotes, os quais foram contados, pesados em balança analítica, medidos com o auxílio de um paquímetro e analisados macroscopicamente, através da observação de alguma malformação visível.

2.5. Análise morfométrica das placentas ao 14º dia de prenhez

Para análise morfométrica das placentas, foram utilizadas dez lâminas dos grupos I e II e analisadas as regiões do disco placentário. As medidas foram restringidas as regiões do labirinto, trofospôncio e células trofoblásticas gigantes. A captura da imagem foi efetuada por meio de câmera de Vídeo Sony®, acoplada ao microscópio Olympus® Bx50. A morfometria foi realizada através de aplicativo Morfometria de Linhas, calibrado em micrômetros, associado ao do programa Optimas® 6.2 para Windows.

A morfometria de pontos foi realizada pela quantificação, através da gráticula de 110 pontos, onde foram contados os seguintes elementos: Vascularização materna, vascularização fetal e Células trofoblásticas sinciciais, na região do labirinto; as células trofoblásticas, e trofoblastos sinciciais, na região do trofospôncio, além das células trofoblásticas gigantes, sendo analisados na objetiva de 40X, onde foram contados 15 campos por região placentária escolhidos aleatoriamente.

2.6. Análise Estatística

Os dados da quantificação dos sítios de implantações, o número de neonatos e seus respectivos pesos e tamanhos, além das mensurações do disco placentário foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, onde as médias foram comparadas pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).

2.7. Teste de TUNEL

Foi utilizado para detectar a ocorrência de apoptose pela fragmentação do DNA. Três lâminas silanizadas contendo cortes de sítio de implantação e placenta com 14 dias de desenvolvimento, de cada grupo, foram desparafinados, hidratados e incubados por 5 minutos à temperatura ambiente em 30 mM Tris/HCl (pH 7,8), continuando por mais 10 minutos a 37° C na presença de pepsina (800 U/ml) para expor as ligações livres de DNA. Após a lavagem com Tris/HCl, os cortes foram pré-incubados por 10 minutos com tampão A (30 mM Tris/HCl, pH 7,2), 140 nM de cacodilato de sódio e 1mM de cloreto de cobalto) e então colocados em câmara úmida por 60 minutos a 37° C com tampão A contendo 0,2 U/L deoxinucleotidil transferase terminal (TdT) e 15 M biotina-16-dUTP. A reação foi então interrompida por uma lavagem de 15 minutos em tampão citrato (300 nM de NaCl 30 mM de citrato de sódio, pH 7,3) à temperatura ambiente. Os cortes foram lavados novamente em TBS contendo 1% de

albumina sérica bovina e finalmente com estreptoavidina conjugada Cy-3 por 20 minutos. Os cortes foram lavados novamente em TBS [12]. Em seguida, as lâminas foram montadas e os cortes observados em microscópio óptico de luz e fotografados.

3. Resultados

3.1 Contagem e histologia dos sítios de implantação

A análise estatística das médias do número de sítios de implantação nos animais dos grupos experimentais revelou que o tratamento com o metronidazol reduziu significativamente os sítios em relação ao controle (Tabela 1).

Os sítios de implantação nas ratas do grupo tratadas com placebo apresentaram-se totalmente inseridos na parede do útero. Histologicamente esses sítios mostraram-se constituídos por trofoblastos, alguns com atividade mitótica, citotrofoblastos poliplóides e rica vascularização. O epitélio luminal apresentou-se característico do tipo simples colunar e na decídua foram visualizadas várias glândulas endometriais (Figs. 1A, 1B, 1C e 1D). Os sítios de implantação no grupo tratado apresentaram as mesmas características histológicas do controle (Figs. 2A, 2B, 2C e 2D).

3.2. Peso, análise morfológica e histoquímica das Placentas

Houve uma redução estatisticamente significativa no peso das placentas das ratas tratadas com metronidazol quando comparada as dos animais do grupo placebo (Tabela 1).

Na análise morfológica das placentas, com 14 dias de desenvolvimento, tanto dos animais do grupo I como do grupo II, apresentaram as mesmas características histológicas, caracterizando-se pela presença da região da decídua bastante vascularizada e a região do disco placentário bem desenvolvido, com as três camadas: camada do labirinto, região mais externa e

a mais espessa, caracterizada pela presença de lacunas contendo vasos maternos e fetais. A camada do trofospongio na qual se observa trofoblastos indiferenciados. A última camada é formada pelas células trofoblásticas gigantes, as quais se misturam com a decídua (Figs. 3A, 3B, 3C, 3D, 3E e 3F).

A análise histoquímica não revelou alterações significativas no teor de fibras colágenas, elásticas e reticulares (Tabela 2).

3.3. Análise morfológica das placentas

A análise estatística das médias da área total do disco placentário mostrou que o grupo II apresentou a menor média diferindo significativamente do grupo controle (Tabela 1). Nesse grupo também foram evidenciadas diferenças significativas na região do labirinto para os parâmetros trofoblastos sinciciais, e vascularização materna e fetal (Tabela 3). Na camada de trofospongio, a média das células trofoblásticas e trofoblastos sinciciais também foram menores em relação ao controle, diferindo significativamente (Tabela 4).

3.4. Apoptose

O teste de TUNEL mostrou atividade apoptótica nos sítios de implantação e placentas com 14 dias de desenvolvimento independente do tratamento (Figs. 4 e 5).

3.5. Contagem e aferição do peso e comprimento dos neonatos

Não foram observados nenhum indício de malformação na cabeça, tronco e membros dos neonatos. No entanto, houve uma redução significativa no número e peso dos neonatos no grupo tratado com o metronidazol em relação ao placebo, porém sem afetar o seu comprimento (Tabela 5).

4. Discussão

Os resultados da presente pesquisa mostraram que o tratamento com o metronidazol na dosagem de 130 mg/kg reduziu significativamente o número de sítios de implantação em relação ao grupo controle, não sendo observado locais de absorção. Este fato refletiu significativamente na redução do número dos neonatos, porém não causando malformações. Esses resultados estão compatíveis com os achados de Mudry et al [8] que descreveram uma diminuição na viabilidade de embriões implantados em ratas tratadas com metronidazol antes do acasalamento. Esses autores atribuíram esse efeito a atuação do metronidazol sobre os folículos ovarianos das fêmeas tratadas, descartando um efeito pós-fecundação, pois o tempo decorrido entre a administração da droga e o acasalamento foi de 24 horas ou mais. No entanto, os resultados dessa pesquisa mostraram que o metronidazol pode também interferir na interação blastocisto endométrio quando administrado após o acasalamento. Assim, levando-se em consideração que o tempo de vida média plasmática do metronidazol é de 8 a 10 horas [13,14], poderia haver um efeito citotóxico sobre alguns ovócitos liberados, que seria proporcional a dose ou tempo de administração, como sugerido por vários autores em estudos com o metronidazol em células germinativas masculinas [9,15].

A análise estatística das médias dos pesos das placentas, área total do disco placentário, dos parâmetros trofoblastos sinciciais, vascularização materna e fetal, na região do labirinto, e dos parâmetros células trofoblásticas e trofoblastos sinciciais, na região do trofospongio, aos 14 dias de getação nos animais do grupo tratado, diminuíram significativamente quando comparados aos do grupo controle, tendo reflexo na redução do peso dos neonatos. Isto poderia estar associado à redução dos níveis dos hormônios gonadotróficos LH e FSH, visto que a administração do metronidazol na dosagem de 200 e 400mg/kg durante 30 dias e 60 por via intraperitoneal levou a redução dos níveis de testosterona, FSH e LH em ratos machos [16,17]. Dessa forma, alterações nos níveis dessas gonadotrofinas, que desempenham um papel

sinérgico no desenvolvimento dos folículos ovarianos, ovulação e implantação [18], poderia levar a diminuição de liberação de andrógenos, estrógeno e progesterona responsáveis pela diferenciação morfológica e funcional do trofoblasto durante a gestação, além de atuarem gradativamente sobre a camada basal do endométrio, aumentando a sua espessura devido à mitose e crescimento das glândulas endometriais, proliferação do estroma e neoformação vascular e formação das artérias espiraladas, eventos importantes para desenvolvimento normal da placenta e conseqüentemente, do feto [19, 20, 21].

A atividade apoptótica foi observada nos sítios de implantação e placentas com 14 dias de desenvolvimento independentemente do tratamento, mostrando desta forma que o tratamento com o metronidazol na dosagem de 130 mg/kg por via oral, não interferiu com o processo apoptótico natural da placenta durante a gestação. Segundo Smith; Baker; Symond [22], a apoptose atinge todas as células da placenta ocorrendo durante toda a gestação, porém com maior freqüência no período final [23, 24, 25], exercendo um papel importante no mecanismo de remodelação placentária, auxiliando na manutenção adequada das proporções teciduais [22,26], pois para o sucesso da implantação embrionária é necessário que haja um equilíbrio entre proliferação e morte celular. Isso se torna importante, pois o aumento da taxa de apoptose nas células decíduais e trofoblásticas estão associados aos casos de aborto espontâneo [27].

Com relação à análise histoquímica, não houve alterações significativas no teor de fibras colágenas, elásticas e reticulares, nos sítios e placentas dos animais do grupo tratado quando comparado ao grupo controle. Várias pesquisas têm demonstrado ação do metronidazol, na dosagem de 180 mg/kg, por via oral, no processo de reparação tecidual acelerando da contração da ferida, síntese de colágeno e epitelização, promovendo precocidade na cicatrização estimulando diretamente os fibroblastos, principais células envolvidas nesse processo, porém em doses mais altas pode produzir citotoxicidade nessas células [28, 29], impedindo a síntese de colágeno, elastina, fibronectina, glicosaminoglicanas e proteases, necessários para o

remodelamento tecidual durante a cicatrização [30, 31]. Contudo, há indícios de que o metronidazol não atue diretamente sobre os fibroblastos, e sim, diminuído a duração da fase inflamatória, permitindo a ação mais rápida dessas células no processo de cicatrização [32] o que foi reforçado pelo nosso estudo, pois tanto nos sítios de implantação como nas placentas não há processos inflamatórios. Assim, concluímos que o metronidazol administrado em ratas prenhes, por via oral, na dosagem de 130 mg/Kg, nos dois terços iniciais da gestação interfere na interação blastocisto endométrio e desenvolvimento fetal, reduzindo o número de embriões implantados, peso e componentes da placenta, além do número e peso dos neonatos, sem no entanto, alterar a taxa de apoptose e componentes da matriz extracelular decidual e placentária. Isto sugere que o uso desse medicamento deve ser evitado nas fases iniciais da gestação.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela concessão da bolsa de mestrado.

5. Referências

- [1] Bendesky A, Menéndez D. Metronidazol: una visión integral. Rev Fac Med UNAM 2001; 44(6):255-9.
- [2] Lossick, JG, Kent HL. Trichomoniasis: trends in diagnosis and management. Am J Obstet Gynecol 1991; 165(4): 1217-22.
- [3] Paavonen J, Mangioni C, Martin MA, Wajszczuk CP. Vaginal clindamycin and oral metronidazole for bacterial vaginosis: a randomized trial. Obstet Gynecol 2000; 96 (2):256-60.
- [4] Pérez-Trallero L, Iglesias L. Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. Enferm Infecc Microbiol Clin 2003; 21(9): 520-9.

- [5] Cudmore SL, Delgaty KL.; Hayward-McClelland SF, Petrin DP, Garber GE. Treatment of Infections Caused by Metronidazole-Resistant *Trichomonas vaginalis*. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17(4): 783-93.
- [6] Black DJ, Ellsworth A. Practical overview of antibiotics for family physicians. *Clinical Family Practice* 2004; 6(1): 265-89.
- [7] Struthers BJ, Sear GD, Skobie IL. Metronidazole appears not to be a human teratogen: review of literature. *Infect. Dis Obstet Gynecol* 1997; 5(5): 326-35.
- [8] Mudry MD, Martinez-Flores I, Palermo AM, Carballo MA, Egozcue J, Caldes MG. Embryo lethality induced by metronidazole (MTZ) in *Rattus norvegicus*. *Teratog Carcinog Mutagen* 2001; 21(3): 197-205.
- [9] Mudry M. D, Palermo AM, Merani MS, Carballo MA. Metronidazole-induced alterations in murine spermatozoa morphology. *Reprod Toxicol* 2007; 23(2): 246 – 52.
- [10] Kazy Z, Puhó E, Czeizel AE. Teratogenic potential of vaginal metronidazole treatment during pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005; 123 (2): 174-78.
- [11] Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS. Animais de laboratório: criação e experimentação. Rio de Janeiro, editora Fio Cruz 2002; 388 p.
- [12] Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sason S. A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992; 119(3): 493-501.
- [13] Freeman CD, Klutman NE, Lamp KC. Metronidazole. A therapeutic review and update. *Drugs* 1997; 54(5): 679-409.
- [14] Gardner TB, Hill DR. Treatment of Giardiasis *Clin Microbiol Rev* 2001; 14(1): 114-28.
- [15] El-Nahas AF, El-Ashmawy IM.. Reproductive and cytogenetic toxicity of metronidazole in male mice. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol* 2004; 94(5): 226-31.

- [16] Grover JK, Vats V, Srinavas M, Das SN, Jha P, Gupta DK, Mitra DK. Effect of metronidazole on spermatogenesis and FSH, LH and testosterone levels of pre-Pubertal rats. *Indian J Exp Biol* 2001; 39(11): 1160-2.
- [17] Sohrabi D, Alipour M, Awsatmellati A. Effect of Metronidazole on Spermatogenesis, Plasma Gonadotrophins and Testosterone in Male Rats. *Iranian J Pharm Res* 2007; 6(4): 279-83.
- [18] Stabenfeldt GH, Davidson AP. Reproduction and lactation. In J.G. Cunningham, *Textbook of Veterinary Physiology*, 3^a edição 2002; 374-428.
- [19] Zybina, TG, Zybina EV, Kiknadze II, Zhelezova AI. Polyploidization in the trophoblast and uterine glandular epithelium of the endotheliochorial placenta of silver fox (*Vulpes fulvus* desm.), as revealed by the DNA content. *Placenta* 2001; 22(2): 490-8.
- [20] Natale A, Candiani M, Merlo D, Izzo S, Gruft L, Busacca M. Human chorionic gonadotropin level as a predictor of trophoblastic infiltration into the tubal wall in ectopic pregnancy: a blinded study. *Fertil Steril* 2003; 79(4): 981-6.
- [21] Sutherland A. Mechanisms of implantation in the mouse: differentiation and functional importance of trophoblast giant cell behavior. *Developmental biology* 2003; 258 (2): 241-51.
- [22] Smith SC, Baker PN, Symonds EM. Placental apoptosis in normal human pregnancy. *Am J Obstetr Gynecol* 1997; 177(1): 57-65.
- [23] Boss PK, Buckeridge EJ, Poole A, Thomas MR. New insights into grapevine flowering. *Functional Plant Biology* 2003; 30(6): 593-606.
- [24] Straszewski-Chavez SL, Abrahams VM, Funai EF, Mor G. X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) confers human trophoblast cell resistance to Fasmediated apoptosis. *Mol Hum Reprod* 2004; 10 (1): 33-41.

- [25] Gu Y, Jow GM, Moulton BC, Lee C, Sensibar JA, Park-Sarge OK, Chen TJ, Giborit G. Apoptosis in decidual tissue regression and reorganization. *Endocrine Soc* 2005;135(3): 1272-9.
- [26] Correia-da-Silva G, Bell SC, Pringle JH, Teixeira NA. Patterns of Uterine Cellular proliferation and Apoptosis in the Implantation Site of the Rat During Pregnancy. *Placenta* 2004; 25(6): 538-47.
- [27] Kokawa K, Shikone T, Nakano R. Apoptosis in human chorionic villi and deciduas during normal embryonic development and spontaneous abortion in the first trimester. *Placenta* 1998; 19(1): 21-6.
- [28] Rao CM, Ghosh A, Raghobama C, Bairy KL. Does metronidazole reduce lipid peroxidation in burn injuries to promote healing? *Burns* 2002; 28(5): 427-9.
- [29] Girish, M. B.; Patil, P. A. The influence of some azoles on wound healing in albino rats. *Indian J Pharmacol* 2005; 37(4): 247-50.
- [30] Amadeu, TP, Coulomb B, Desmouliere A, Costa AMA. Cutaneous wound healing: myofibroblastic differentiation and in vitro models. *Int. J. Low. Extrem. Wounds* 2003; 2(2): 60-8.
- [31] Hildebrand KAMD ; Gallant-Behm CL, Kydd AS, Hart DA. The basics of soft tissue healing and general factors that influence such healing. *Sports Med. Arthrosc. Review* 2005; 13(3): 136-44.
- [32] Sampaio CPP, Biondo-Simões MLP, Trindade LCT, Farias RE, Pierin RJ, Martins RC. Alterações inflamatórias provocadas pelo metronidazol em feridas: estudo experimental em ratos. *J Vasc Bras* 2009; 8(3): 232-7.

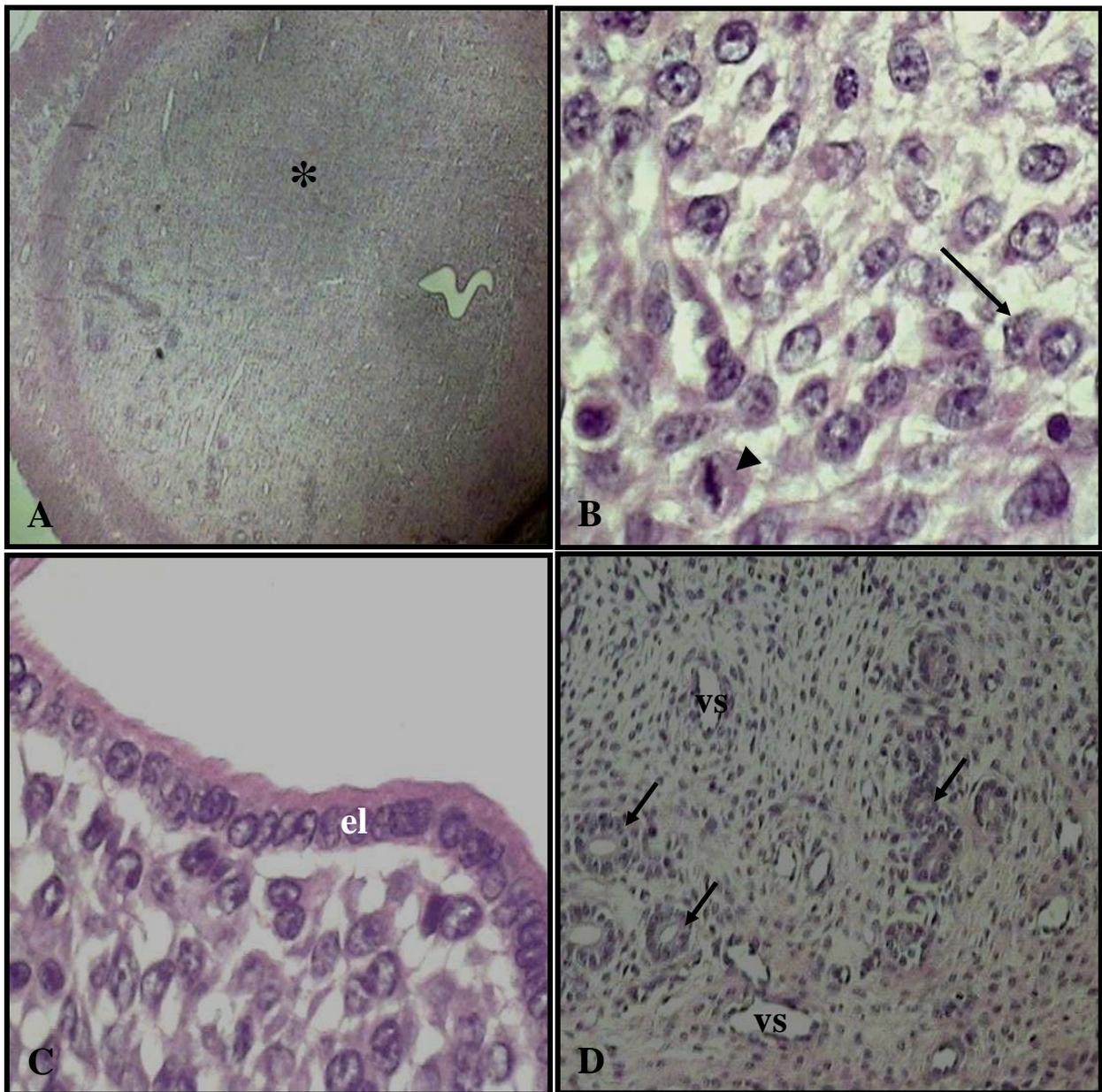


Figura 1: Fotomicrografia do útero de ratas do grupo placebo. A - Sítio de implantação (*) de ratas do grupo controle totalmente inserido na parede do útero. H.E. \pm 42X. B - Trofoblasto em mitose (ponta de seta) e citotrofoblasto poliplóide (seta). H.E \pm 428X. C - Epitélio luminal (el). H.E \pm 428X. D - Vasos sanguíneos (vs) e glândulas endometriais (setas curtas). H.E. \pm 107X.

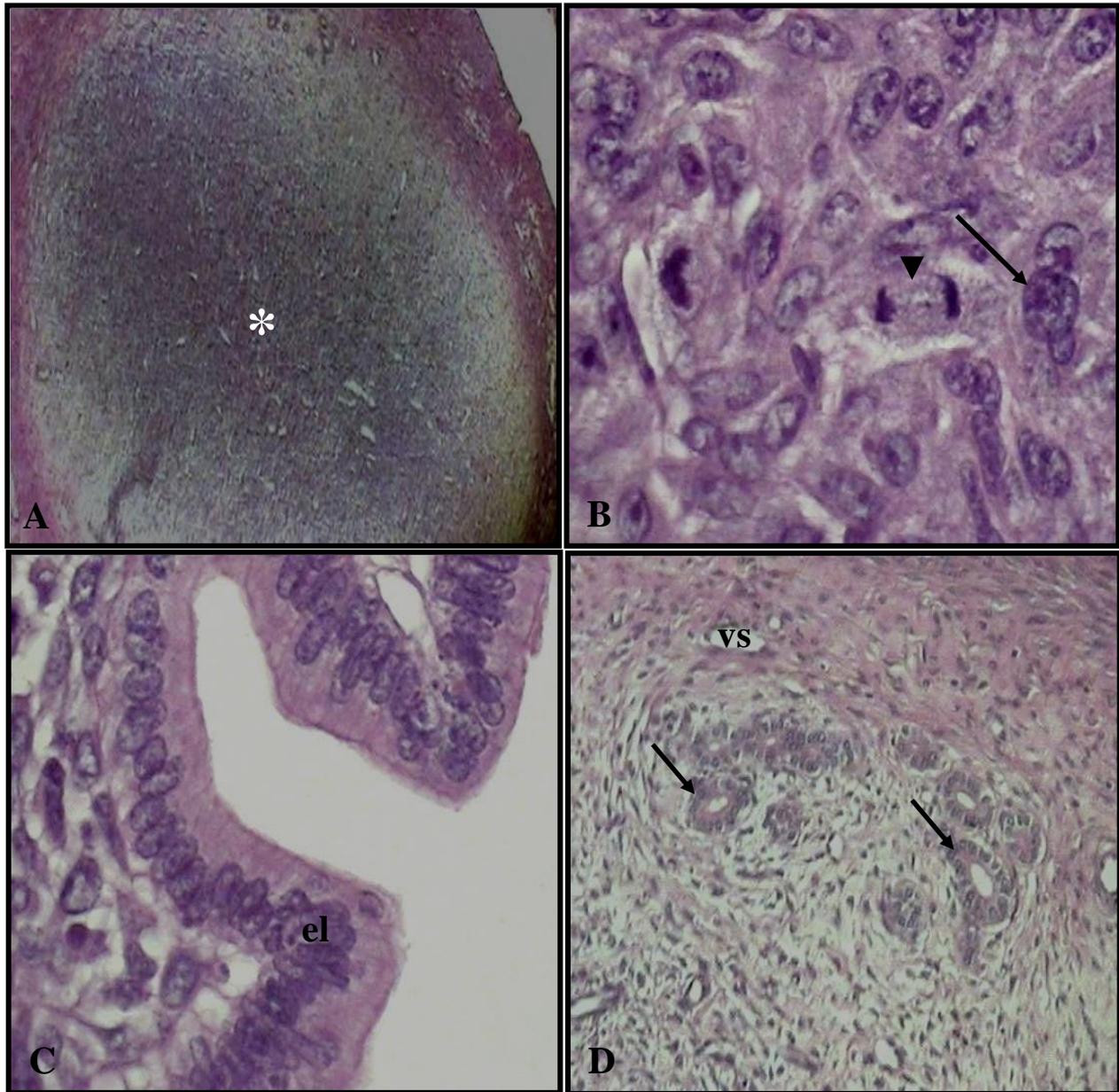


Figura 2: Fotomicrografia do útero de ratas do grupo tratado. A - Sítio de implantação (*) de ratas do grupo tratado totalmente inserido na parede do útero. H.E. \pm 42X. B - Trofoblasto em mitose (ponta de seta) e citotrofoblasto poliplóide (seta). H.E \pm 428X. C - Epitélio luminal (el). H.E \pm 428X. D - Vasos sanguíneos (vs) e glândulas endometriais (setas curtas). H.E. \pm 107X.

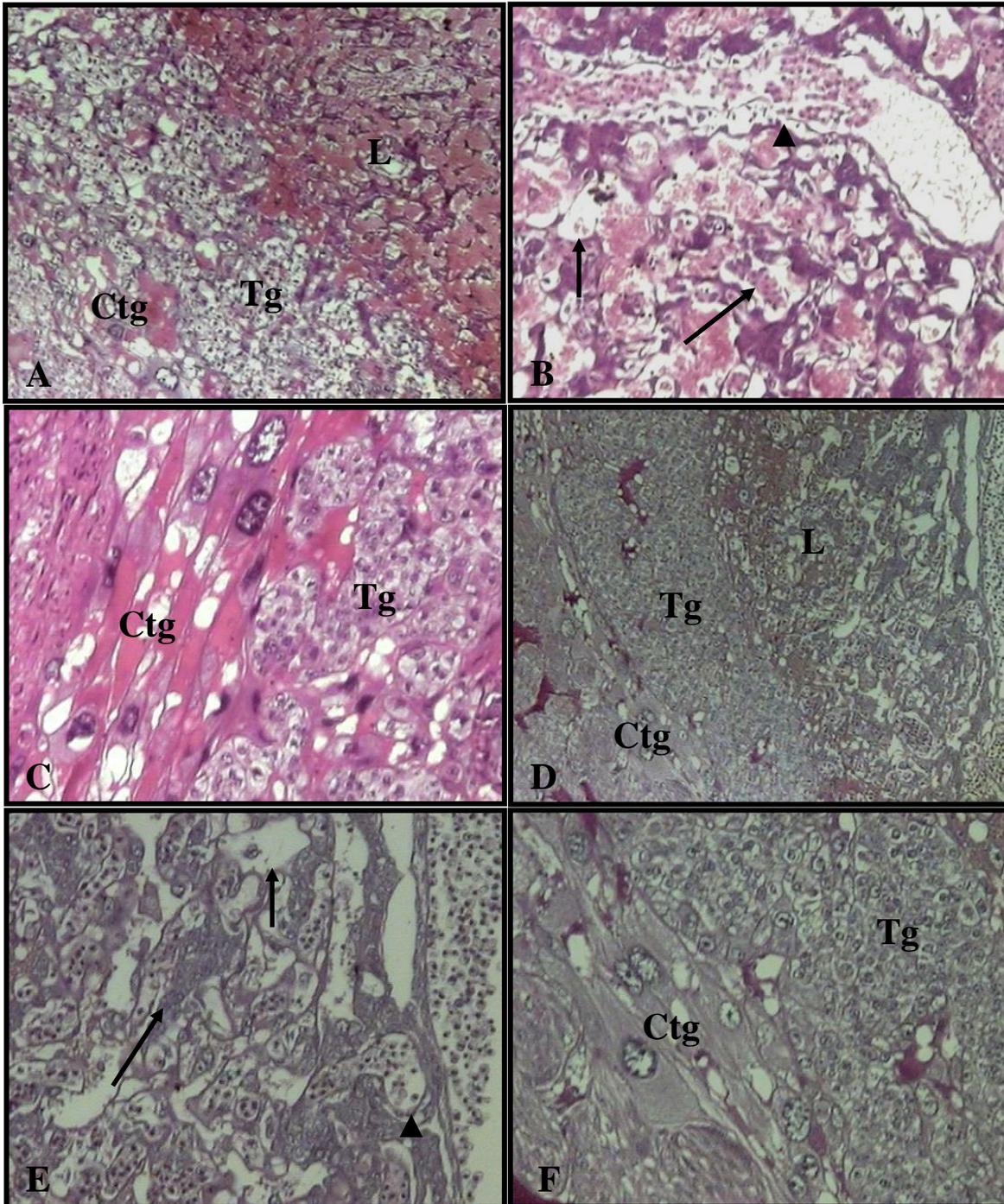


Figura 3: Fotomicrografia do disco placentário de ratas do grupo controle: A - labirinto (L), trofospongio (Tg) e Célula trofoblástica gigante (CTg). H.E. 107X. B – Detalhe do labirinto contendo trofoblastos sinciciais (setas), vasos maternos (setas curtas) e fetais (ponta de setas). H.E. 428X. C – Detalhe do trofospongio (Tg) e células trofoblasticas gigantes (Ctg). H.E. 428X. Disco placentário de rata do grupo tratado: D - labirinto (L), trofospongio (Tg) e Célula trofoblástica gigante (CTg). H.E. 107X. E - Detalhe do labirinto contendo trofoblastos sinciciais (setas), vasos maternos (setas curtas) e fetais (ponta de setas). H.E. 428X. F – Detalhe do trofospongio (Tg) e células trofoblasticas gigantes (Ctg). H.E. 428X.

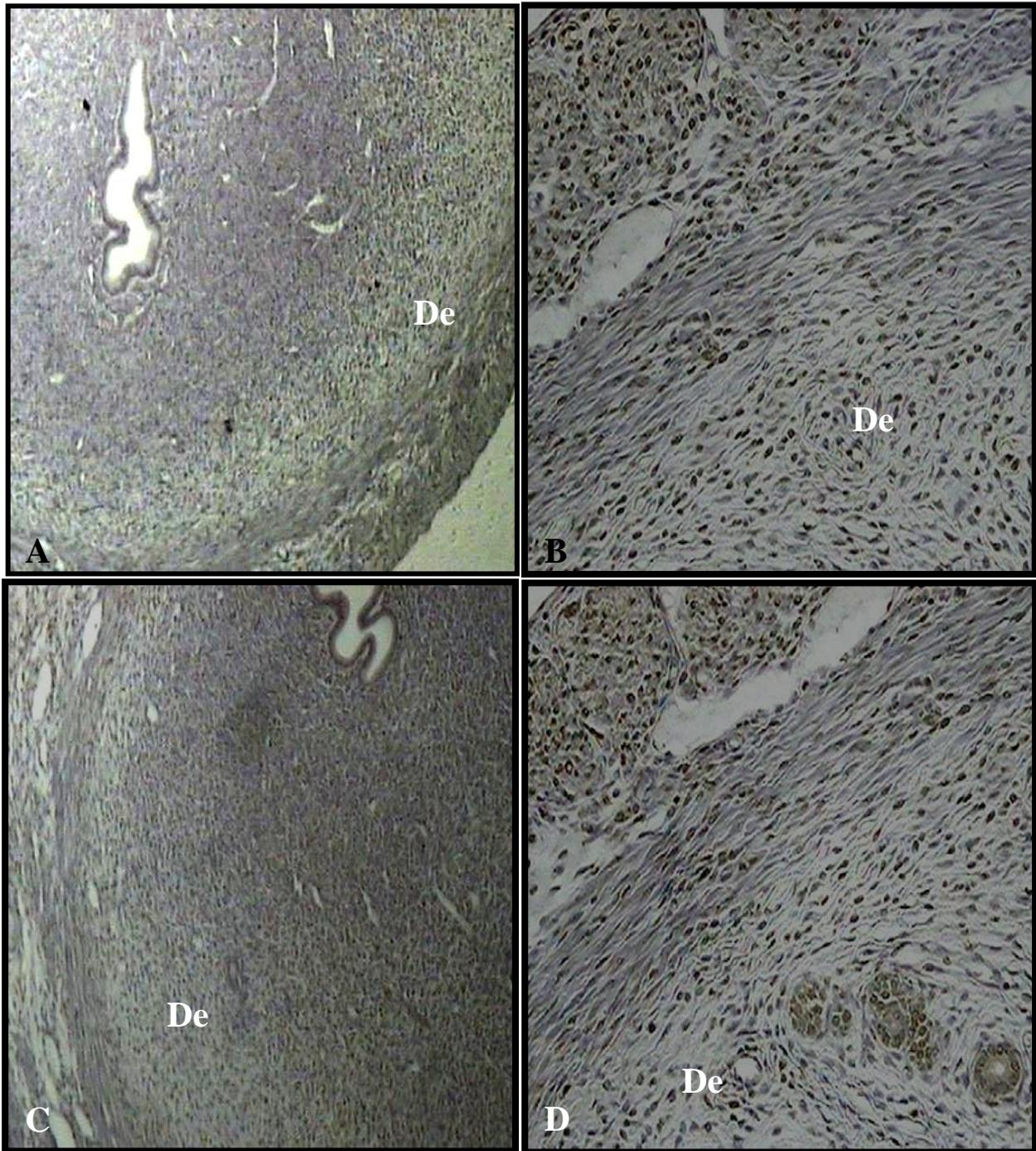


Figura 4: Teste de TUNEL. Sítio de implantação (A) e (B) controle e (C) e (D) tratado. Observar marcação positiva apenas na decídua (De). $\pm 42X$ (A e C) e $107X$ (B e D).

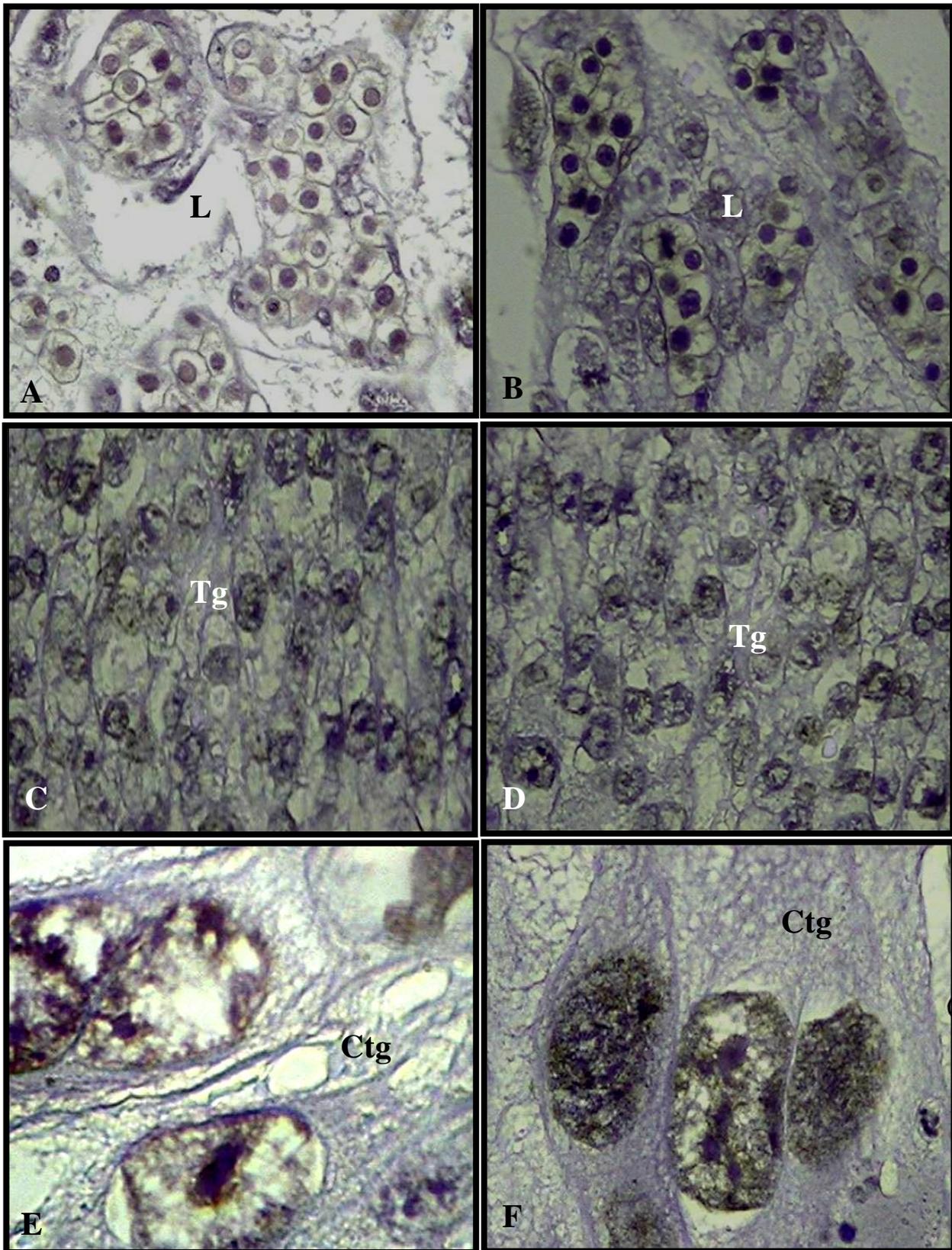


Figura 5: Teste de TUNEL. Disco placentário. Labirinto (L), Trofospongio (Tg) e Células trofoblásticas gigantes (Ctg). (A), (C) e (E) controle, (B), (C) e (D) tratado. Observar marcação positiva (setas). $\pm 428X$.

Tabela 1: *Médias e desvio padrão do número de sítios de implantação (SI), pesos (g) das placentas (PL) aos 14 dias de prenhez e área (μm^2) total (AT) do disco placentário nos grupos experimentais.

	GI	GII	F^P
SI	14,20 \pm 0,83a	11,80 \pm 1,64b	5,202 ^{0,0129}
PL	0,284 \pm 0,015a	0,231 \pm 0,027b	3,231 ^{0,0039}
AT	4251,83 \pm 16,87a	3542,51 \pm 13,72b	4,402 ^{0,0309}

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).

Tabela 2: Histoquímica do disco placentário nos grupos experimentais. Reação intensa (++) , moderada (\pm) e fraca (+).

	GI	GII
Fibras colágenas	++	++
Fibras elásticas	+	+
Fibras reticulares	\pm	\pm

Tabela 3: *Médias e desvio padrão dos elementos constituintes da região do labirinto do disco placentário, com 14 dias de desenvolvimento, nos grupos experimentais.

	GI	GII	F ^P
VM	18,35 ± 1,16a	15,03 ± 1,18b	2,953 ^{0,0285}
VF	15,26 ± 1,44a	12,32 ± 1,04b	3,388 ^{0,0101}
TS	59,32 ± 2,09a	52,50 ± 2,33b	5,232 ^{0,0041}

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney (P<0,05). VM = vasos maternos; VF = vasos fetais e TS = trofoblasto sincicial.

Tabela 4: *Médias e desvio padrão dos elementos constituintes da região do trofospongio e células trofoblásticas gigantes do disco placentário, com 14 dias de desenvolvimento, nos grupos experimentais.

	GI	GII	F ^P
CT	42,18 ± 1,78a	39,15 ± 0,96b	2,315 ^{0,0161}
TS	7,28 ± 0,15a	6,19 ± 0,67b	7,432 ^{0,0402}
CTG	67,89 ± 2,34a	62,08 ± 2,24a	7,012 ^{0,0619}

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney (P<0,05). CT = células trofoblásticas; TS = trofoblasto sincicial e CTG = células trofoblásticas gigantes.

Tabela 5: *Médias e desvio padrão do peso (g) e comprimento (cm) dos filhotes com um dia de nascido dos grupos experimentais.

	GI	GII	F ^P
Número	12,60 ± 0,54a	10,80 ± 1,30b	2,751 ^{0,0325}
Peso	6,78 ± 0,17a	5,54 ± 0,58b	4,657 ^{0,0105}
Comprimento	6,22 ± 0,31a	6,12 ± 0,23a	1,702 ^{0,0796}

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney (P<0,05).

ANEXO