



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

ISMAELA MARIA FERREIRA DE MELO

**Avaliação do efeito da enrofloxacin durante a prenhez e no
desenvolvimento da prole em ratas**

Recife – 2012

ISMAELA MARIA FERREIRA DE MELO

Avaliação do efeito da enrofloxacin durante a prenhez e no desenvolvimento da prole em ratas

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 Concentração em Morfofisiologia Animal

Orientador:

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira

Co-orientadora:

Prof^a. Dr^a. Valéria Wanderley Teixeira

Recife - 2012

ISMAELA MARIA FERREIRA DE MELO

“AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ENROFLOXACINA DURANTE A PREENHIZ E NO DESENVOLVIMENTO DA PROLE EM RATAS”

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

Aprovada em de Fevereiro de 2012

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira (Orientador)

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

Prof. Dr. Luiz Carlos Alves – LIKA/CPqAM

Prof. Dr. Anísio Francisco Soares - UFRPE

“Dedico este trabalho a meu querido Deus, sempre presente em todos os momentos da minha vida”.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, por estar sempre presente na minha vida, me guiando, me protegendo, me dando luz e muita força a cada minuto, por nunca ter me desamparado nos momentos de dificuldades nem nos momentos de alegria. Obrigada Senhor, por fazer parte da minha vida, toda a minha glória pertence e devo a ti.

A minha mãe, Maria do Amparo de Melo, a pessoa que eu mais amo nessa terra, obrigada pelos conselhos, pela força, pela paciência, por sempre cuidar de mim e pelo amor infinito sempre presente. Obrigada por tudo minha mãe querida, te amo.

Ao meu amado pai Ismael Ferreira de Melo e minha querida irmã Ismália Melo, pela força, paciência, carinho, compreensão e amor. Amo vocês.

Ao meu irmão, Sandro Melo, pela força e alegria de sempre. Obrigada;

A todas as pessoas da minha família que mesmo às vezes estando longe, sei que sempre estavam torcendo por mim. Obrigada de coração;

Aos meus orientadores Álvaro Aguiar Coelho Teixeira e Valéria Wanderley Teixeira, pelo ensino, amizade, carinho, compreensão, paciência. Serei eternamente grata a vocês, muito obrigada;

As minhas grandes amigas Welma Emídio, Solange Bezerra, Hilda Michelly, Ana Paula Castor, Ana Cláudia, Talita Camila e Thiciane por serem sempre tão maravilhosas, companheiras, verdadeiras e realmente AMIGAS. Obrigada por tudo sempre;

Aos meus companheiros do laboratório que sempre me trazem tantas alegrias, descontração e carinho: Carina Helena, Rose, Lílian, Caroline, Cíntia, Clóvis, Fernanda Miguel, Fernanda Ângelo, Shimene, Franklin, Thiago, Gyl, Sandra, Laise, Ana Janaína, Nani, Andresa, Lílian (entomologia), Cristiane. Obrigada sempre;

Ao professor Fabrício Bezerra de Sá e a Fabiana Félix (querida Fabi), pelos ensinamentos sobre o método de Tunel, muito obrigada pela paciência e amizade.

Agradeço também a André por sempre cuidar das cobaias com tanto carinho;

A Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Área de Histologia, por possibilitar a realização deste trabalho;

Ao CNPq, pela concessão da bolsa;

As cobaias, por terem dado a vida em pró da ciência, obrigada e meu eterno respeito;

Enfim, agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e torceram por mim. Muito obrigada.

RESUMO

As fluoroquinolonas são freqüentemente usadas na medicina humana e veterinária para tratamento e prevenção de doenças do trato respiratório, digestivo e urinário. Dentro deste grupo podemos destacar a enrofloxacin, um fármaco que apresenta um elevado espectro de atividade frente bactérias Gram positivo e Gram negativo. Sabe-se que as fluoroquinolonas têm a propriedade de atravessar a placenta podendo ter efeitos adversos no feto em desenvolvimento, principalmente se levarmos em consideração que mais da metade das gestações não são planejadas, e assim, um grande número de mulheres pode ser potencialmente expostas a estes fármacos durante o primeiro trimestre de gravidez. No entanto, os mecanismos desses efeitos adversos ainda são desconhecidos. Assim, a presente pesquisa teve como objetivo avaliar o efeito da enrofloxacin em ratas prenhas no desenvolvimento da placenta e da prole. A enrofloxacin (Baytril®) foi administrada na dose de 5 mg/kg, diariamente, via intramuscular, durante toda a gestação. As placentas foram analisadas morfológicamente, morfometricamente e imunohistoquimicamente aos sete, quatorze e vinte dias de prenhez. Os resultados mostraram que no grupo tratado houve redução significativa do número de sítios de implantação, do peso e área total do disco placentário aos quatorze e vinte dias de desenvolvimento, e alterações quantitativas nos elementos constituintes das camadas do labirinto, trofospongio e células trofoblásticas gigantes da placenta. 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 a enrofloxacin em relação ao controle, porém sem afetar o seu comprimento. Não houve alteração na análise histoquímica, porém, o teste de TUNEL mostrou atividade apoptótica mais intensa apenas nas placentas com 14 dias de desenvolvimento do grupo tratado em relação ao controle. Com isso concluímos que a enrofloxacin quando administrada na dosagem de 5 mg/kg durante prenhez em ratas interfere no desenvolvimento placentário, por alterar os elementos constituintes da placenta e aumentar a apoptose no terço médio da gestação, tendo como reflexo a redução no número e peso dos neonatos.

PALAVRAS-CHAVE: Enrofloxacin, prenhez, desenvolvimento placentário, desenvolvimento fetal, reprodução.

ABSTRACT

Fluoroquinolones are frequently used in human and veterinary medicine for treatment and prevention of disease respiratory tract, digestive and urinary. Within this group we can highlight the enrofloxacin, a drug that presents a wide spectrum of activity against Gram positive and Gram negative. It is known that fluoroquinolones are the property of crossing the placenta and may have adverse effects on the developing fetus, especially when you consider that more than half of pregnancies are unplanned, and thus a large number of women may be exposed to potentially these drugs during the first trimester of pregnancy. However, the mechanisms of these adverse effects are still unknown. Thus, the present study was to evaluate the effect of enrofloxacin in pregnant rats on placental development and offspring. Enrofloxacin (Baytril ®) was administered at a dose of 5 mg / kg daily intramuscular throughout pregnancy. The placentas were analyzed morphologically, morphometrically and immunohistochemical tests for seven, fourteen and twenty days of pregnancy. The results showed that the treated group there was significant reduction in the number of implantation sites, weight and placental total area of the disk at fourteen and twenty days of development, and quantitative changes in the constituents of the layers of the labyrinth, trophoblastic giant cells and trofospongio of the placenta. There were observed no evidence of malformation in the head, trunk and limbs of neonates. However, there was a significant reduction in the number and weight of neonates in enrofloxacin-treated group compared to control, but without affecting its length. There was no change in the histochemical analysis, however, the TUNEL test showed stronger apoptotic activity in the placentas with only 14 days of development in the treated group compared to control. With this we conclude that enrofloxacin when administered at a dose of 5 mg/kg in rats during pregnancy interferes with placental development by altering the constituents of the placenta and increase apoptosis in the middle third of pregnancy, and reflecting the reduction in the number and weight of neonates.

KEYWORDS: Enrofloxacin, pregnancy, placental development, fetal development, reproduction.

SUMÁRIO

Capítulos.....	Pág.
AGRADECIMENTOS.....	v
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
I INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1. Histórico dos antibióticos.....	16
2.2. O uso de antibióticos na gestação.....	17
2.3. Classificação das quinolonas.....	19
2.4. Quinolonas na gestação.....	20
2.5. Desenvolvimento da placenta.....	21
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24
II Efeito da enrofloxacin sobre a interação blastocisto endométrio e seu reflexo no desenvolvimento placentário e fetal em ratas.....	30
RESUMO.....	31
ABSTRACT.....	32
INTRODUÇÃO.....	33
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
2.1. Animais e grupos experimentais.....	34
2.2. Exame colpocitológico.....	35
2.3. Tratamento com enrofloxacin.....	35
2.4. Análise morfológica.....	35
2.4.1. <i>Número de embriões implantados e análise das placentas.....</i>	35
2.4.2. <i>Análise morfométrica das placentas aos 14° e 20° dia de prenhez...</i>	36

2.5. Contagem do número, aferição do peso e comprimento dos neonatos..	36
2.6. .Análise estatística.....	37
2.7. Teste de Tunel.....	37
3. RESULTADOS.....	37
3.1. Contagem e histologia dos sítios de implantação.....	38
3.2. Peso, análise histológica e histoquímica das placentas.....	38
3.3. Análise morfométrica das placentas.....	38
3.4. Apoptose.....	39
3.5 Contagem e aferição do peso e comprimento dos neonatos.....	39
4. DISCUSSÃO.....	39
5. CONCLUSÃO.....	41
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
ANEXO.....	53

Ficha Catalográfica

M528a Melo, Ismaela Maria Ferreira de
 Avaliação do efeito da enrofloxacina durante a prenhez e no
 desenvolvimento da prole em ratas / Ismaela Maria Ferreira de
 Melo. -- Recife, 2012.
 58 f. : il.

 Orientador (a): Álvaro Aguiar Coelho Teixeira.
 Dissertação (Mestrado em Biociência Animal) – Universidade
 Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e
 Fisiologia Animal, Recife, 2012.
 Inclui anexo e referências.

 1. Enrofloxacina 2. Morfofisiologia animal 3. Sítio de
 implantação 4. Placenta 5. Reprodução 6. Ratos I. Teixeira,
 Álvaro Aguiar Coelho, Orientador II. Título

CDD 636.089

1. INTRODUÇÃO

As quinolonas, também referidas como 4 quinolonas, ácido carboxílico quinolônico ou fluoroquinolonas são antibióticos sintéticos comumente usados em humanos e medicina veterinária (SHEN et al., 2004). São drogas bactericidas que apresentam um espectro de atividade que depende de sua concentração (SARASOLA et al., 2002; ALIABADI; LEE, 2003). As de uso clínico, tem uma estrutura formada por dois anéis, com um nitrogênio na posição 1, um grupo carbonila na posição 4 e um grupo carboxila na posição 3 (ALÓS, 2003). São freqüentemente usadas nas infecções dos sistemas urogenital, respiratório e digestivo em gado, ovinos e galinha caipira (HUEBSCHLE et al., 2006).

Distribuem-se amplamente pelo organismo alcançando altas concentrações na urina, rins, bÍlis, tecido prostático, ossos e pulmão (CIRO; LESLY, 2002). Também alcançam níveis satisfatório no meio intracelular, pelo qual tem ação contra diversos organismos intracelulares (O`DONNEL; STEVEN, 2000). O tempo de meia vida varia entre três a quinze horas e sua eliminação varia de acordo com o agente, no entanto a maioria é eliminada por via renal (CIRO; LESLY, 2002). São bem absorvidos após administração oral, com moderada a excelente biodisponibilidade (HOOPER, 2001; OLIPHANT; GREEN, 2002).

As fluoroquinolonas agem inibindo a topoisomerase IV em bactérias Gram positivas e a topoisomerase II nas Gram negativas, também conhecida por DNA-girase, que apresenta as mesmas funções da topoisomerase IV (DRLICA et al., 2008). As quinolonas são classificadas em gerações, cada uma com distintas indicações e distintos espectros de ação antimicrobiana. Conforme as gerações vão avançando, se amplia o espectro contra germes intracelulares e Gram positivos, chegando hoje em dia até a quarta geração para cobrir anaeróbios (O`DONNEL; STEVEN, 2000).

A literatura relata que as fluoroquinolonas têm a propriedade de atravessar a placenta (GIAMARELLOU et al., 1989; KIM et al., 2003) podendo ter efeitos adversos no feto em desenvolvimento, embora isto não tenha sido demonstrado em seres humanos. O uso das fluoroquinolonas tem aumentado na última década (GOOSSENS et al., 2005; LINDER et al., 2005; FERECHE et al., 2006), sendo bastante utilizadas nas infecções do trato urinário (ITU), pois atingem maior

concentração nos túbulos renais. A ITU é uma das complicações médica mais comum da gestação, levando a um quadro clínico conhecido por bacteriúria gestacional, devido às mudanças anatômicas e fisiológicas que ocorrem no sistema urinário durante este período (APPROBATO et al., 2000).

Alguns estudos com o uso das fluoroquinolonas demonstraram efeitos adversos quando administrado durante a gestação. Linseman; Hampton; Branstetter (1995) trataram camundongos com ciprofloxacina, 50 e 200 mg/kg/dia, e ácido pipemídico, 50, 400 e 3.150 mg/kg/dia. Os grupos tratados na dose de 200 mg/kg/dia de ciprofloxacina durante cinco dias ou com ácido pipemídico (400 e 3.150 mg/kg/dia) durante sete dias tiveram maior incidência de lesões articulares como perda dos condrócitos, degeneração da matriz e erosão da cartilagem articular que os camundongos tratados com ácido pipemídico (400 mg/kg/dia) durante 14 dias, sugerindo a possibilidade de uma reversibilidade das lesões à medida que o tempo de tratamento se prolonga.

Approbato et al. (2000) administrando ciprofloxacina em ratas, nas dosagens de 50 e 100 mg/kg durante os setes primeiros dias de prenhez observaram alterações no peso e no reflexo dos filhotes nos primeiros dias de vida. Kim et al. (2000, 2004) relataram que fluoroquinolona DW-16 não só é materno e embriologicamente tóxica, mas também teratogênica em ratos. Neste estudo, a administração de DW-16 durante o período organogênico resultou na diminuição do peso corporal e da ingestão de alimento, aumentou a taxa de reabsorção fetal, reduziu o peso fetal e da placenta e elevou a incidência de malformações.

A administração oral de moxifloxacina em ratas, na dosagem de 500mg/kg, até o parto resultou em um período de gestação prolongada, aumentou a mortalidade pós-natal e reduziu o peso das crias (VON, KEUTZ; SCHLUTER, 1999). Ao contrário, quinolonas como norfloxacina, levofloxacina, e sparfloxacina não induziram perceptíveis efeitos tóxicos na gestação e no parto de ratas, nem no desenvolvimento pós-natal e crescimento dos filhotes. (TAKAYAMA et al., 1995).

As fluoroquinolonas não são drogas de primeira escolha na gestação de mulheres (VALLANO; ARNAU, 2009), no entanto, levando-se em consideração que mais da metade das gestações não são planejadas, um grande número de mulheres pode ser potencialmente expostas a estes fármacos durante o primeiro trimestre de

gravidez (BAR-OZ et al., 2009). Por isso, grandes esforços têm sido realizados para desenvolver novas fluoroquinolonas antibioticoterapia com melhores propriedades farmacocinéticas e perfis de segurança (BAR-OZ et al., 2009).

Launay et al. (2009) relataram que as fluoroquinolonas atravessam a placenta em uma baixa extensão, e que essa restrição pode ser devido a diminuição da difusão passiva e ou extrusão da placenta por transportadores, fazendo com que os substratos das fluoroquinolonas sejam transportados pela placenta (ALVAREZ et al., 2008). Efeitos adversos decorrente do uso das fluoroquinolonas durante a gestação foram relatados, caracterizando-se principalmente pela ocorrência de produção de artropatias em animais jovens. Os filhotes são especialmente sensíveis para desenvolver lesões na cartilagem devido a esta droga (NAGAI et al., 2002).

As fluoroquinolonas também são freqüentemente usadas na pecuária para tratamento e prevenção de doenças (SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006), dentre elas podemos destacar a enrofloxacin, desenvolvida em 1980, é um fármaco que apresenta um elevado espectro de atividade frente as bactérias Gram positivo e Gram negativo e *Pseudomonas aeruginosa* bactéria altamente resistente a antibióticos (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010). Este fármaco é amplamente utilizado em infecções do trato urinário, respiratório e gastrointestinal além de infecções da pele, ossos, articulações e otites (GANIÈRE; MÉDAILLE; ETORÉ, 2004; MARTINEZ; MCDERMOTT; WALKER, 2006; MARÍN et al., 2007).

A enrofloxacin é uma fluoroquinolonas desenvolvida para uso exclusivo na medicina veterinária. É um derivado do ácido carboxílico com ação antimicrobiana, através da inibição da DNA girase (VANCUTSEM; BABISH; SCHWARK, 1990). No organismo de mamíferos e em de outras espécies a enrofloxacin é de-etilada à ciprofloxacina, um metabólito que contribui para a atividade do medicamento (KAARTINEN et al., 1995, 1997; ANADON et al., 1999; INTORRE et al., 1997; GARCIA et al., 1999).

Muitas fluoroquinolonas não são atualmente recomendadas para crianças e mulheres gestantes, por causa de possíveis efeitos adversos sobre a cartilagem articular, além da reprodução e desenvolvimento de embriões observados em estudos experimentais com ratos e aves, respectivamente (KIM et al., 2004). No entanto, há poucos trabalhos que abordem os efeitos da enrofloxacin na reprodução. Assim, este trabalho teve o objetivo de

avaliar morfometricamente, imunohistoquimicamente e histologicamente, a placenta, de ratas tratadas com enrofloxacin durante a prenhez.

2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Histórico dos antibióticos

Antibióticos são compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de fungos ou bactérias (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010). Podem ser classificados como bactericidas, quando causam a morte da bactéria, ou bacteriostático, quando promovem a inibição do crescimento microbiano (WALSH, 2003).

Após a segunda metade do século XIX, cientistas como Robert Koch identificaram micro-organismos responsáveis por doenças como tuberculose, cólera e febre tifóide. Nessa época, as pesquisas tinham por objetivo a busca de substâncias químicas que apresentassem atividade antibiótica (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010). O pesquisador Paul Ehrlich, foi responsável pelo conceito primário de que uma substância química poderia interferir com a proliferação de micro-organismos em concentrações toleráveis pelo hospedeiro (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010). Em 1910, Ehrlich desenvolveu o primeiro antibiótico de origem sintética, salvarsan (WALSH, 2003), usado contra a sífilis. Poucos avanços foram conseguidos nos vinte anos seguintes até a introdução da proflavina em 1934 (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010), amplamente utilizada na Segunda Guerra Mundial em feridas profundas, contudo, ela era muito tóxica para ser utilizado em infecções sistêmicas.

Gerhard Domagk em 1935 descobriu o vermelho de prontossil, que apresentava ação contra espécies de *Streptococcus*.(GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010). Este pró- fármaco originou uma nova classe de antibióticos sintéticos, as sulfas ou sulfonamidas (WRIGHT, 2005), a primeira classe de agentes contra infecções sistêmicas no começo dos anos 1940 (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

O grande marco na descoberta de antibióticos ocorreu em 1928 com Alexander Fleming (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010), com a penicilina (PROJAN; SHLAES, 2004), a qual apresentava atividade superior a das sulfas. Como consequência da segunda guerra mundial os processos de industrialização da

penicilina avançaram e o interesse na descoberta e desenvolvimento de novos antibióticos (PROJAN; SHLAES 2004).

Entre os anos de 1940 e 1960 foram descobertos vários antibióticos de origem natural de microrganismos entre eles a estreptomicina (NUSSBAUM, et al., 2006) a eritromicina (SUARÉZ; GUDIOL, 2009) o cloranfenicol (DURANTE-MANGONI et al., 2009) entre outros. Nas décadas de 60 e 80 foram introduzidos os semi-sintéticos, obtidos a partir de protótipos naturais de microbianos (FERNANDES, 2006). Entre 1980 e 2000 os antibióticos foram obtidos por processos genômicos e por triagens de coleções de compostos e também foi introduzido as fluoroquinolonas sintéticas na metade dos anos de 1980 (DZIDIC; SUSKOVIC; KOS, 2008). Em 2001, foi introduzido no mercado apenas um único antibiótico de origem sintética a linezolida (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

2.2 O uso de antibióticos na gestação

A prescrição de fármacos durante a gestação é um tema vinculado diretamente com a saúde pública devido aos problemas que já causaram a administração de talidomida e o dietilestilbestrol (PONSA; VICENS, 2005). Os obstetras tem mudado de opinião nos últimos anos: De uma atitude negativa e de máxima cautela, para uma de enfoque mais permissivo. Tudo isso se deve ao melhor conhecimento das mudanças farmacodinâmicas durante a gestação e os efeitos dos fármacos sobre os fetos (BOSENS, 2001).

A administração de antibióticos durante a gravidez causa várias preocupações aos médicos e aos pacientes, devido ao risco para o feto, uma vez que o tratamento não deve comprometer a gravidez nem causar dano ao feto (MYLONAS, 2011). Além disso, vários relatos têm levantado alguma preocupação sobre o uso de tratamento com antibióticos durante a gravidez, por exemplo, a eritromicina foi associada com estenose pilórica em crianças (MAHON; ROSENMAN; KLEIMAN, 2001). No entanto, de acordo com estudos recentes, a grande maioria dos antibióticos não causa danos graves ao feto se usado e dosado corretamente (NAHUM; UHL; KENNEDY, 2006; HASS; MASCHMEYER, 2008). Em termos de obstetrícia, o sucesso do resultado é o tratamento precoce das infecções ((MYLONAS, 2011).

Na gestação, são produzidas uma série de trocas fisiológicas que afetam a cinética dos fármacos (PONSA; VICENS, 2005). Entre elas, estão a função gastrointestinal. A alta concentração de progesterona induz a redução da motilidade gastrointestinal e a um aumento do fluxo sanguíneo no intestino afetando a absorção gástrica e intestinal. Essas modificações podem afetar (aumentar, diminuir ou não) a absorção oral da droga e, portanto sua biodisponibilidade (QASQAS et al., 2004; PONSA; VICENS, 2005;). A hemodinâmica, alterando a quantidade de água no corpo, assim como a distribuição e eliminação de fármacos. O total de água do corpo aumenta como resultado da expansão intra e extravascular levando a modificações no volume de distribuição de drogas polares (CARLIN; ALFIREVIC. 2008). Além disso, modificações na eliminação renal e hepática e na concentração de proteínas plasmáticas e ácidos graxos livres que interferem no transporte dos fármacos (PONSA; VICENS, 2005;).

Efeitos farmacológicos das drogas estão relacionados com sua concentração no sítio de ação (REBUELTO; LOZA, 2010). Baixas doses podem ocasionar perdas terapêuticas ao contrário, altas doses podem produzir efeitos tóxicos (REBUELTO; LOZA, 2010). Os defeitos congênitos se situam ao redor de 3% de todas as gestações. Delas, 65-70% são de origem desconhecida e somente 2-3% tem como causa a administração de fármacos (PONSA; VICENS, 2005;).

A gestação pode melhorar a biotransformação das drogas por dois mecanismos: aumentando o acesso da droga para o seu local de metabolismo, particularmente o fígado e aumentando a atividade do sistema enzimático, especialmente o hepático citocromo P-450(CYP) (REBUELTO; LOZA, 2010). A diminuição da ligação a proteínas do plasma devido a hipoalbuminemia relacionada a gestação podem aumentar a metabolização de drogas de baixas extração hepática, enquanto que o aumento do fluxo sanguíneo hepático pode aumentar a biotransformação de drogas de alta extração hepática. A atividade de algumas drogas metabolizadas por enzimas pode ser afetada, ou aumentando ou diminuindo, pela ação dos esteróides sexuais progesterona e estradiol (REBUELTO; LOZA, 2010).

Os antimicrobianos que podem ser empregados sem risco durante a gestação são os betalactâmicos e os macrolídeos. As penicilinas tem sido os antibióticos mais

utilizados durante a gravidez. A ampicilina e amoxicilina (penicilinas de amplo espectro) tem absorção oral mais baixa e sua eliminação mais rápida quanto menor o tempo de gestação (ASSAEL et al., 1979) devendo por isso ser administrado com doses maternas mais altas e maior frequência de administração, com o objetivo de se conseguir doses efetivas no líquido amniótico (PHILIPSON, 1981), outras drogas utilizadas são as cefalosporinas, a eritromicina, espiramicina a clindamicina e a vancomicina.

Ao contrário, os antimicrobianos que devem ser proibidos ou ao menos indicados com cautela durante a gestação são: as tetraciclina, os fenicóis por causarem efeitos teratogênicos e malformações respectivamente (TOAF; DAVID 1966; WEISS; GLAZKO; WESTON, 1960), os aminoglicosídeos pela sua ototoxicidade e efeitos sobre o crescimento ósseo (SNIDER et al., 1980), as sulfonamidas os nitrofuranos, os imidazoles e as quinolonas na qual se detectaram alterações articulares e retardo no crescimento (PONSA; VICENS, 2005;).

2.3 Classificação das quinolonas

As quinolonas são classificadas em gerações, cada uma com distintas indicações e distintos espectros de ação antimicrobiana. Conforme as gerações vão avançando, se amplia o espectro contra germes intracelulares e Gram positivos, chegando hoje em dia até a quarta geração para cobrir anaeróbios (O'DONNEL; STEVEN, 2000).

A primeira geração compreende as quinolonas originais composta desta forma pelos ácidos nalixídico, oxolínico, pipemídico e cinoxacino. Essas moléculas foram associadas com pobre biodisponibilidade oral, limitada distribuição dentro dos sistemas de tecido e um espectro de atividade limitada para *Escherichia coli* e vários outros organismos Gram-negativo (MARTINEZ; MCDERMOTT; WALKER, 2006).

As quinolonas de segunda geração se caracterizam fundamentalmente pela presença constante do flúor na posição seis e do metil piperazina na posição sete do antimicrobiano (CIRO; LESLY, 2002). Exibem aumento da atividade antibacteriana contra *Enterobacteriaceae* e outras bactérias Gram-negativas assim como *Pseudomonas aeruginosa* e alguma atividade contra certos cocos Gram-positivos.

Mudanças estruturais associadas com a segunda geração aumentaram sua biodisponibilidade oral e seu sistema de distribuição. As quinolonas desta categoria são norfloxacin, ciprofloxacina, enrofloxacin, danofloxacin, difloxacina e marbofloxacina (MARTINEZ; MCDERMOTT; WALKER, 2006).

A terceira geração exibe aumento da atividade contra bactérias Gram-positivas, anaeróbias e micobactérias. Ela também exibe excelente biodisponibilidade oral e foi associada com um prolongado tempo de meia-vida, boa distribuição nos tecidos, alta atividade antimicrobiana, excelentes propriedades farmacocinéticas, baixa perda de proteínas e relativamente menos efeitos colaterais (PEREZ et al., 2002; MARTINEZ; MCDERMOTT; WALKER, 2006). Essa geração de fluoroquinolonas tem baixa toxicidade no sistema nervoso central e exibe menor interação com o sistema citocromo P450 (BALL, 2000). Essa categoria inclui orbifloxacino, levofloxacino, sparfloxacina e grepafloxacina (MARTINEZ; MCDERMOTT; WALKER, 2006).

As quinolonas de quarta geração ampliaram seu espectro sobre anaeróbios e germes atípicos, que permitem utilizá-las em infecções polimicrobianas como as abdominais e ginecológicas. Elas incluem garenofloxacina, gatifloxacina, moxifloxacina e trovafloxacina retirada do mercado em 1997 por ter produzido hepatite fulminante e morte em muitos pacientes (TRUCCO, 2000; CATHERINE; GARY, 2002). Tem boa disponibilidade e penetração nos tecido respiratório e nos fluidos, com tempo de meia vida de doze horas, podendo ser administrados em uma única dose diária (CAIERÃO et al., 2004).

2.4 Quinolonas na gestação

As fluoroquinolonas são drogas bactericidas sintéticas que agem sobre a topoisomerase II e IV do DNA bacteriano responsável pela helicoidização da dupla fita de DNA, além disso, são compostos que apresentam efeitos dependentes de sua concentração no organismo (SADARIYA et al., 2010). Esse grupo de antibióticos são frequentemente usados na medicina veterinária especialmente para tratamento respiratório, gastrointestinal, piodermatites, infecções urinárias, otites entre outros processos infecciosos (GANIÈRE; MEDAILLE; ETORÉ, 2004; MARTINEZ; MCDERMOTT; WALKER, 2006; MARÍN et al., 2007).

As fluoroquinolonas são frequentemente prescritas para o tratamento da infecção do trato urinário (CHYSKY et al., 1991). Todavia, a segurança dessas drogas

na gestação tem sido abordada em numerosos estudos (LARSEN et al., 2001). No entanto, os inibidores da girase para mulheres grávidas, crianças e adolescentes é considerada contra-indicada como medida de precaução (DEL FIOLE; GERENUTTI; GROppo; 2005). Devido a sua ação sobre as cartilagens, estão contra indicadas em crianças e gestantes salvo raras exceções (ALÓS, 2003). Alguns dos seus efeitos tóxicos têm sido relatados em cães e gatos. Além do mais, em espécies veterinárias foram relatadas toxicidades, incluindo distúrbios gastrointestinais (como náuseas, vômito e diarreia), artropatias em animais jovens, especialmente cachorros, e toxicidades oculares incluindo degeneração da retina em gatos (MARTINEZ; MCDERMOTT; WALKER, 2006). Entretanto, com base nos dados existentes, a exposição as fluoroquinolonas durante a gestação em humanos não está associado com o aumento do risco de malformação, efeitos adversos no sistema músculo fetal, aborto espontâneo, prematuridade, retardo do crescimento intra-uterino, ou desordens pós-natal (LEE et al., 2008).

As fluoroquinolonas não são drogas de primeira escolha na gestação de mulheres (VALLANO; ARNAU, 2009), no entanto, levando-se em consideração que mais da metade das gestações não são planejadas, um grande número de mulheres pode ser potencialmente expostas a estes fármacos durante o primeiro trimestre de gravidez. Por isso, grandes esforços têm sido realizados para desenvolver novas fluoroquinolonas antibioticoterapia com melhores propriedades farmacocinéticas e perfis de segurança (BAR-OZ et al., 2009).

2.5 Desenvolvimento da placenta

A placenta é basicamente um órgão de troca entre o sangue materno e o fetal; essas trocas se efetuam através da barreira placentária presente na região labiríntica placentária; a qual apresenta-se muito elaborada nos roedores (LOPES,1992).

Uma das funções da placenta dos mamíferos é a de assegurar uma ótima nutrição em todas as fases do desenvolvimento fetal (GUDMUNDSSON; DUBIEL; SLADKVICIUS, 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).

A placenta hemocorial (discoidal) é encontrada na maioria dos roedores e humanos. Neste tipo de placenta há um grande desenvolvimento das vilosidades coriônicas, mais agrupadas na região basal do concepto. Em ratos, Enders e Welsh (1993), observaram que se desenvolve uma placenta hemocorial labiríntica, contendo o trofoblasto em contato com o tecido conjuntivo materno não modificado, e que a resposta decidual inicia-se em função da presença do blastocisto na luz do útero decidual, antes do trofoblasto alcançar a lâmina basal do epitélio uterino.

A placenta hemocorial forma na interface do tecido materno uterino e do embrião implantado, especificamente na parte do endométrio modificado do justaposto à vesícula coriônica, a *decidua basalis* e associa-se à parte do trofoblasto fetal, o qual frequentemente desenvolve vilosidades frondosas e é conhecido como o *chorion frondosum*. O trofoblasto se diferencia rapidamente em duas camadas: o citotrofoblasto e o sinciciotrofoblasto. O sinciciotrofoblasto desenvolve lacunas multinucleadas, entre as quais a camada citotrofoblástica projeta vilos (DONNELLY; CAMPLING, 2008). O sinciciotrofoblasto se torna progressivamente uma camada achatada cobrindo cada vilo e separando a camada citotrofoblástica das lacunas (a qual se torna descontínua), que se fundem para formar espaços intervilosos (BROLIO et al., 2010).

Enzimas trofoblástica corroem artérias e veias espirais da parede uterina, e assim as vilosidades ramificadas tornam-se banhadas em sangue materno, o qual é substituído três a quatro vezes por minuto. Células mesenquimais fetais invadem o vilo e geram redes capilares conectando as artérias e a veia umbilical. A circulação materna e a fetal, portanto, tornam-se separadas em áreas de transferências especializadas entre células citotrofoblásticas (BROLIO et al., 2010).

Os ápices dos vilos tendem a não desenvolver um núcleo mesenquimal, mas permanecem como solidas colunas de células citotrofoblásticas. Enquanto alguns vilos permanecem flutuando no espaço interviloso, outros assumem a função de ancoragem para estar em contato com as células deciduais materna. As células citotrofoblásticas também se espalham sobre a *decidua basalis* para formarem a camada completa- a concha citotrofoblástica (BROLIO et al., 2010). Além disso, as

células citotrofoblásticas invadem artérias espirais remodelando-as para que o sangue entre no espaço interviloso com pressão mais baixa que a pressão arterial normal (BROLIO et al., 2010).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALIABADI, F. S.; LEE, P. Pharmacokinetic-pharmacodynamic integration of danofloxacin in the calf. **Res. Vet .Sci.**, London, v. 74, n. 3, p. 247-259, 2003.
- ALÓS, J. I. Quinolonas. **Enfer. Infec. Microbiol. Clin.**, Barcelona, v. 21, n. 5, p. 261-268, 2003.
- ALVAREZ, A. I.; PÉREZ, M.; PRIETO, J. G.; MOLINA, A. J.; REAL, R.; MERINO, G. "Fluoroquinolone efflux mediated by ABC transporters" **J. Pharm .Sci.**, Washington, v. 97, n. 9, p. 3483-3493, 2008.
- ANADON, A.; MARTINEZ-LARRANAGA, M.R.; DIAZ, M.J.; FERNANDEZ-CRUZ, M.L.; MARTINEZ, M.A.; FREJO, M.T.; MARTINEZ, M.; ITURBE, J.; TAFUR, M. Pharmacokinetic variables and tissue residues of enrofloxacin and ciprofloxacin in healthy pigs. **Am. J. Vet. Res**, Chicago, v. 60, p. 1377-1382, 1999.
- ASSAEL, B. M.; COMO, M. L.; MIRAGLIA, M.; PARDI, G.; SERENI, F. Ampicillin kinetics in pregnancy. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, London, v. 8, n. 3, p. 286-288, 1979.
- APPROBATO, M. S.; TEIXEIRA, R. P.; MOURA, K. K. V.; ISAAC, C. R.; ALVES, K. K.; CARVALHO, F. N.; SOUZA, M. F. Uso da ciprofloxacina durante a prenhez de ratas: efeitos sobre a mãe e fetos. **Rev. Bras. Ginecol. Obst.**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 10, p. 647-651, 2000.
- BALL, P. Quinolones generations: natural history or natural selection. **J. Antimicro. Chemother.** London, v. 46, p. 17-24, 2000.
- BAR-OZ, B.; MORETTI, M. E.; BOSKOVIC, R.; O'BRIEN, L.; KOREN, G.; . The safety of quinolones: a meta analysis of pregnancy outcomes. **Euro. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, Amsterdam, v.143, n. 2, p. 75-78, 2009.
- BOSENS, M. Antibiotic and pregnancy. **Rev. Med. Brux.**, Bruxelles, v. 22, n. 9, p. 260-263, 2001.
- BROLIO, M. P.; AMBRÓSIO, C. E.; FRANCIOLLI, A. R.; MORINI, A. C.; GUERRA, R. R.; MIGLINO, M. A. Barreiras placentárias e sua função de transferência nutricional. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v. 34, n. 4, p. 222-232, 2010.
- CARLIN, A. ALFIREVIC, Z. Physiological changes of pregnancy and monitoring. **Clin. Obstet. Gynaec.**, London, v. 22, n. 5, p. 801-823, 2008.
- CATHERINE M. O.; GARY M. G. Quinolones: a comprehensive review. **Amer. Fam. Physician**, Kansas City, v. 65, n. 3, p. 455-464, 2002.
- CAIERÃO, J.; ANTUNES, A. G.; STEFENS, M.; MARCO, M.; D'AZEVEDO, P. A. Novos antimicrobianos: realidade e perspectiva. **NewsLab**, São Paulo, v. 66, p. 80-90, 2004.
- CETIN, I. ALVINO, G. Intrauterine growth restriction: Implications for placental metabolism and transport: a review. **Placenta**, London, v. 30, n. 1, p. 77-82, 2009.
- CHYSKY, V.; HULLMANN,R.; SCHACHT, P.; KAPILA, K.; ECHOLS, R.; ARCIERI, G. Safety of ciprofloxacin in children: worldwide clinical experience based on compassionate use. Emphasis on joint evaluation. **Infect**, New Road, v.19, n. 4, p. 289-296, 1991.

- CIRO, M. V.; LESLY, S. Z. Nuevas y viejas quinolonas. **Rev. Medi. Hered.**, Lima, v. 13, n. 4, 153-160, 2002.
- DEL FIOLE, F. S.; GERENUTTI, M.; GROppo, F. C. Antibiotics and pregnancy. **Pharmazie**, Berlin, v. 60, n. 7, p. 483-493, 2005.
- DONNELLY, L.; CAMPLING, G. Functions of the placenta. **Anaesth Intensive Care Med**, Abingdon, v. 9, n. 3, p. 124-127, 2008.
- DRLICA, K.; MALIK, M.; KERNS, R. J.; ZHAO, X. Quinolone-mediated bacterial death. **Antimicrobi. Agent. Chemother.**, Washington, v. 52, n. 2, p. 385-392, 2008.
- DURANTE-MANGONI, E.; GRAMMATIKOS, A.; UTILI, R.; FALAGAS, M. E. Do we still need the aminoglycosides? **J. Antimicrob. Agents**, Amsterdam, v. 33, n. 3, p. 201-205, 2009.
- DZIDIC, S.; SUSKOVIC, J.; KOS, B. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects. **Food. Technol. And. Biotech.**, Zagreb, v. 46, p. 11-21, 2008.
- 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.
- FERNANDES, P. Antibacterial discovery and development the failure of success? **Nat. Biotech.**, New York, v. 24, n.12, p. 1497-1503, 2006.
- FERECH, M.; COENEN, S.; KUMAR-MALHOTRA, S.; DVORAKOVA, K.; HENDRICKX, E.; SUETENS, C.; GOOSSENS, H. European surveillance of antimicrobial consumption (ESAC): outpatient quinolone use in Europe. **J. Antimicro. Chemother.**, London, v. 58, n. 2, p. 423-427, 2006.
- GANIERE, J. P.; MÉDAILLE, C.; ETORÉ, F. In vitro antimicrobial activity of orbifloxacin against *Staphylococcus intermedius* isolates from canine skin and ear infections. **Res. Vet. Sci**, London, v. 77, n. 1, p. 67-71, 2004.
- GARCIA, O. H.; GORLA, N.; LUDERS, C.; POLONI, G.; ERRECALDE, C.; PRIETO, G.; PUELLES, I. Comparative pharmacokinetics of enrofloxacin and ciprofloxacin in chickens. **J. Vet. Pharmacol. Ther.** Oxford, v. 22, p. 209-212, 1999.
- GIAMARELLOU, H.; KOLOKYTHAS, E.; PETRIKKOS, G.; GRAZIS, J.; ARAVANTINOS, D.; SFIKAKIS, P. Pharmacokinetics of three newer quinolones in pregnant and lactating women. **The. Amer. Jour. Med.**, New York, v. 87, n. 5, p. 49-51, 1989.
- GOOSSENS, H.; FERECHE, M.; STICHELE, R. V.; ELSEVIERS, M. Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. **The Lancet**, London, v. 365, n. 9459, p. 579-587, 2005.
- GUDMUDSSON, S.; DUBIEL, M.; SLADKVICIUS, P. Placental morphologic and functional imaging in high-risk pregnancies. **Semin. Perinatol**, New York, v. 33, p. 270-280, 2009.
- GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectiva para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.
- HAAS, A. MASCHMEYER, G. Antibiotic therapy in pregnancy. **Dtsch. Med. Wochenschr.**, Stuttgart, v. 133, n. 11, p. 511-515, 2008.

- HOOPER, D. C. Mechanisms of action of antimicrobials: focus on fluoroquinolones. **Clin. Infect. Disease.**, Chicago, v. 32, p. 9-15, 2001.
- HUEBSCHLE, O. J.; AYLING, R. D.; GODINHO, K.; LUKHELE, O.; TIPURA-ZAIRE, G.; ROWAN, T. G.; NICHOLAS, A. J. Danofloxacin (Advocin) reduces the spread of contagious bovine pleuropneumonia to healthy in contact cattle. **Res. Vet. Sci.**, London, v. 81, n. 3, p. 304-309, 2006.
- INTORRE, L.; MENGOZZE, G.; BERTINI, S.; BEGLIACCA, M.; LICHETTI, E.; SOLDANI, G. The plasma kinetics and tissue distribution of enrofloxacin and its metabolite, ciprofloxacin in the Muscovy duck. **Vet. Res. Commun.** Dordrecht, v. 21, p. 127–136, 1997
- KAARTINEN, L.; SALONEN, M.; ALLI, L.; PYÖRÄLÄ, S. Pharmacokinetics of enrofloxacin after single intravenous, intramuscular and subcutaneous injections in lactating cows. **J. Vet. Pharmacol. Ther.** Oxford, v. 9, p. 254–263, 1995.
- KAARTINEN, L.; PAM, S.; PYÖRÄLÄ, S. Pharmacokinetics of enrofloxacin in horses after single intravenous and intramuscular administration. **Equine Vet. J.** London, v. 29, p. 378–381, 1997.
- KIM, J. C.; YUN, H. I.; SHIN, H. C.; HAN, S. S.; CHUNG, M. K. Embryo lethality and teratogenicity of a new fluoroquinolone antibacterial dw-116 in rats. **Archive. Toxicol.**, New York, v. 74, n. 2, p.120-124, 2000.
- KIM, J. C.; BAE, C. S.; KIM, S. H.; YUN, H. I.; PARK, S. C.; SHIN, H. C.; HAN, J.; CHUNG, M. K. Transplacental pharmacokinetics of the new fluoroquinolone DW-116 in pregnant rats. **Toxicol. Letter**, Amsterdam, v. 142, n. 1-2, p. 103-109, 2003.
- KIM, J. C.; SHIN, D. H.; KIM, S.H.; OH, K. S.; JUNG, Y. H.; KWON, H. J.; YUN, H. I.; SHIN, H. C.; CHUNG, M. K. Peri and postnatal developmental toxicity of the fluoroquinolone antibacterial DW-116 in rats. **Food. And. Chemic. Toxicol.**, Oxford, v. 42, n. 3, p. 389–395, 2004.
- LARSEN, H.; NIELSEN, G. L.; SCHONHEYDER, H. C.; OLESEN, C.; SORENSEN, H. T. Birth outcome following maternal use of fluoroquinolones. **J. Antimicrob. Agents.**, Amsterdam, v. 18, n. 3, p. 259-262, 2001.
- LAUNAY, E.; JORAM, N.; JACQUELINE, C.; MIEGEVILLE, A. F.; CAILLON, J.; POTEL, G.; ROZE, J. C.; GUEN, C. G. L. “Efficacy of ciprofloxacin in an experimental model of Escherichia coli chorioamnionitis in rabbits” **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 53, n. 4, p. 1624-1627, 2009.
- LEE, M.; BOZZO, P.; EINARSON, A.; KOREN, G. Urinary tract infections in pregnancy. **Can. J. Psychiatr.**, Canada, v. 54, p. 853-854, 2008.
- LINDER, J. A.; HUANG, E. S.; STEINMAN, M. A.; GONZALES, R.; STAFFORD, R. S. Fluoroquinolone prescribing in the United States: 1995 to 2002. **The. Amer. Jour. Med.**, New York, v. 118, n. 3, p.259-268, 2005.
- LINSEMAN, D.A.; HAMPTON S.A.; BRANSTETTER, D.G. Quinolone-induced arthropathy in the neonatal mouse. Morphological analysis of articular lesions produced by pipemidic acid and ciprofloxacin. **Fund. Appl. Toxicol.**, Orlando, v. 28, n.1, p. 59-64, 1995.

LOPES, C. M. D. Efeitos da desnutrição protéico calórica (DPC) sobre o labirinto placentário de ratas jovens: observação morfológicas ultraestruturais. Doctoral Thesis. **Instituto de Ciências Biomédicas**, universidade de São Paulo, 1992.

MAHON, B. E.; ROSENMAN, M. B.; KLEIMAN, M. B. Maternal and infant use of erythromycin and other macrolide antibiotics as risk factors for infantile e hypertrophic pyloric stenosis., **J. Pediatr.**, Cincinnati, v.139, n. 3, p. 380-384, 2001.

MARÍN, P.; ESCUDERO, E.; FERNÁNDEZ-VARÓN, E.; CÁRCELES, C. M. Pharmacokinetics and Milk penetration of orbifloxacin after intravenous, subcutaneous, and intramuscular administration to lactating goats. **J. Dairy. Sci.**, Champaign, v. 90, n. 9, p. 4219-4225, 2007.

MARTINEZ, M.; MCDERMOTT, P.; WALKER, R. Pharmacology of the fluoroquinolones: a perspective for the use in domestic animals. **j. Vet.**, London, v. 172, n. 1, p. 10-28, 2006.

MYLONAS, I. Antibiotic chemotherapy during pregnancy and lactation period: aspects for consideration. **Arch. Gynecol. Obst.**, Munchen v. 283, n. 1, p. 7-18, 2011.

NAGAI, A.; MIYAZAKI, M.; MORITA, T.; FURUBO, S.; KIZAWA, K.; FUKUMOTO, H.; SANZEN, T.; HAYAKAWA, H.; KAWAMURA, Y. "Comparative articular toxicity of garenoxacin, a novel quinolone antimicrobial agent, in juvenile beagle dogs". **J. Toxicol. Sci.**, Sapporo, v. 27, n. 3, p. 219-228, 2002.

NAHUM, G. G.; UHL, K.; KENNEDY, D. L. Antibiotic use in pregnancy and lactation: what is and is not known about teratogenic and toxic risks. **Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v. 107, n. 5, p. 1120-1138, 2006.

NUSSBAUM, F. V.; BRANDS, M.; HINZEN, B.; WEIGAND, S.; HABICH, D. Antibacterial natural products in medicinal chemistry- exodus or revival? **Angew. Chem.**, New York, v. 45, n. 31, p. 5072-5129, 2006.

O' DONNELL, J.; STEVEN, P. Fluoroquinolones. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, Canada, v. 14, n. 2, p. 489-513, 2000.

OLIPHANT, C. M.; GREEN, G. M. Quinolones: a Comprehensive Review. **American. Family. Physi.**, Kansas City, v. 65, n. 3, p. 455-465, 2002.

PEREZ, S.; SOLANS, C.; BREGANTE, M. A.; PINILLA, I.; GARCÍA, M. A.; HONRUBIA, F. Pharmacokinetics and ocular penetration of grepafloxacin in albino and pigmented rabbits. **J. Antimicrob. Chemother.**, London, v. 50, n. 4, p. 541-545, 2002.

PHILIPSON, A. Persistence of ampicilin in the intrauterine following single and multiple doses to pregnancy women. **Acta. Obstet. Gynecol. Scand.**, Stockholm, v. 60, p. 121-123, 1981.

PONSA, J. M. B.; VICENS, J. M. L. Empleo de antimicrobianos durante el embarazo. **Terapéutica**, España, v. 68, n. 1567, p.1832-1834, 2005.

PROJAN, S. J. SHLAES, D. M. Antibacterial drug discovery: its is all downhill. **Clin. Microbiol. Infect.**, Europe, v. 10, n. 4, p 18-22, 2004.

QASQAS, S. A.; MCPHERSON, C.; FRISHMAN, W. H.; ELKAYAM, U. Cardiovascular pharmacotherapeutic considerations during pregnancy and lactation. **Cardiol . Rev.**, Hagerstown, v. 12, n. 4, p. 201-221, 2004.

- REBUERTO, M. LOZA, M. E. Antibiotic treatment of dogs and cats during pregnancy. **Vet. Med. Int.**, Buenos Aires, v. 14, p. 8, 2010.
- RIQUELME, G. Placental chloride channels: a review. **Placenta**, London, v. 30, p. 659-669, 2009.
- SADARIYA, K. A.; GOTHI, A. K.; PATEL, S. D.; BHAVSAR, S. K.; THAKER, A. M. Safety of moxifloxacin following repeated intramuscular administration in wistar rats. **Vet. World**, India, v. 3, n. 10, p. 449-452, 2010.
- SARASOLA, P.; LEES, P.; ALIABADI, F. S.; MCKELLAR, Q. A.; DONACHIE, W.; MARR, K. A.; SUNDERLAND, S. J.; ROWAN, T. G. Pharmacokinetic and pharmacodynamic profiles of danofloxacin administered by two dosing regimens in calves infected with *Mannheimia (pasteurella) haemolytica*. **J. Antimicrobi. Agent. Chemother.**, Washington, v. 46, n. 9, p. 3013-3019, 2002.
- SARMAH, A. K., MEYER, M. T., BOXALL, A. B. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. **Chemosphere**, Oxford, v. 65, n. 5, p. 725-759, 2006.
- SHEN, J. Y.; KIM, M. R.; LEE, C. J.; KIM, I. S.; LEE, K. B.; SHIM, J. H. Supercritical fluid extraction of the fluoroquinolone norfloxacin and ofloxacin from orally treated-chicken breast muscle. **J. Analytic. Chimi**, Amsterdam, v. 513, n. 2, p. 451-455, 2004.
- SUARÉZ, C.; GUDIOL, F. Antibióticos Betalactámicos. **Enfer. Infec. Microbiol. Clin.**. España, v. 27, n. 2, p. 116-129, 2009.
- SNIDER, D. E.; LAYDE, P. M.; JOHNSON, M. W.; LYLE, M. A. Treatment of tuberculosis during pregnancy. **Amer. Review. Respi. Disease.**, New York, v.122, p. 65-79, 1980.
- TAKAYAMA, S., HIROHASHI, M., KATO, M., SHIMADA, H. Toxicity of quinolone antimicrobial agents. **J. Toxicol. Environ. Health**, Washington, v. 45, p. 1-45, 1995.
- TOAF, R. DAVID, R. Tetracyclines and the teeth. **Lancet**, London, v. 2, p. 281-282, 1966.
- TRUCCO, A. Aspectos microbiológicos de las nuevas quinolonas: levofloxacin, sparfloxacin, trovafloxacin, y grepafloxacin. **Rev. Chil. Infect**, v. 17, n. 1, p. 67-72, 2000.
- VALLANO, A.; ARNAU, J. M. "Antimicrobials and pregnancy". **Enfer. Infec. Microbiol. Clin.**, Barcelona, v. 27, n. 9, p. 536-542, 2009.
- VANCUTSEM, P.M.; BABISH, J.G.; SCHWARK, W.S. The fluoroquinolone antimicrobials: structure, antimicrobial activity, pharmacokinetics, clinical use in domestic animals and toxicity. **Cornell Vet**. Ithaca, v. 80, p. 173-186, 1990.
- VON KEUTZ, E., SCHLUTER, G. Preclinical safety evaluation of moxifloxacin, a novel fluoroquinolone. **J. Antimicrob. Chemother**, v. 43, p. 91-100, 1999.
- WALSH, C. Antibiotics: Actions, Origins, Resistance. **Am. Soc. Microbio.**, Washington, v. 13, n. 11, p. 3059-3060, 2003.

WEISS, C. F.; GLAZKO, A. J.; WESTON, J. K. Chloramphenicol in the newborn infant. A physiologic explanation of its toxicity when given in excessive doses. **N. Engl. J. Med.** Boston, v. 262, p. 787-794, 1960.

WRIGHT, G. D. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. **Adv. Drug. Deliv. Rev.**, Amsterdam, v.57, p. 1451-1470, 2005.

CAPÍTULO II

Efeito da enrofloxacin sobre a interação blastocisto endométrio e seu reflexo no desenvolvimento placentário e fetal em ratas

Effect of enrofloxacin on the blastocyst endometrial interactions and their impact on placental and fetal development in rats

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

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

*Autor para correspondência: Álvaro Aguiar Coelho Teixeira- 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 (AAC Teixeira)

Resumo

Alguns estudos têm mostrado efeitos tóxicos da enrofloxacinina em diversos tecidos. Assim, testamos a hipótese de que a enrofloxacinina pode interferir no desenvolvimento placentário, e gerar efeitos adversos ao feto. A enrofloxacinina (Baytril®) foi administrada na dose de 5 mg/kg, diariamente, i.m., durante toda a gestação em ratas. As placentas foram analisadas morfolologicamente, morfometricamente e imunohistoquimicamente quanto à atividade apoptótica aos sete, quatorze e vinte dias de prenhez. Os resultados mostraram que a enrofloxacinina reduziu o número de sítios de implantação, o peso e área total do disco placentário aos quatorze e vinte dias de desenvolvimento, além dos elementos constituintes da placenta. A análise histoquímica não revelou alterações significativas no teor de fibras colágenas, elásticas e reticulares. O teste de TUNEL mostrou atividade apoptótica mais intensa apenas nas placentas com quatorze dias do grupo tratado. 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, porém sem afetar o seu comprimento. Assim, concluímos que a enrofloxacinina administrada na dosagem de 5mg/kg durante prenhez em ratas interfere no desenvolvimento placentário, refletindo na redução no número e peso dos neonatos.

Palavras-chave: enrofloxacinina, prenhez, desenvolvimento placentário, imunohistoquímica, reprodução.

Abstract

Some studies have shown toxic effects of enrofloxacin in various tissues. Thus, we tested the hypothesis that enrofloxacin may interfere with placental development, and have adverse effects on the fetus. Enrofloxacin (Baytril ®) was administered at a dose of 5 mg / kg daily, im, throughout pregnancy in rats. The placentas were analyzed morphologically, morphometric and immunohistochemical and apoptotic activity at seven, fourteen and twenty days of pregnancy. The results showed that enrofloxacin reduced the number of implantation sites, the weight and the total area of hard placental fourteen and twenty days of development, and the components of the placenta. The histochemical analysis revealed no significant changes in the content of collagen and elastic fibers and reticular. The TUNEL test showed stronger apoptotic activity in the placentas with only fourteen days in the treated group. There were observed no evidence of malformation in the head, trunk and limbs of neonates. However, there was a significant reduction in the number and weight of newborns in the treated group, but without affecting its length. Thus, we conclude that enrofloxacin administered at a dose of 5mg/kg in rats during pregnancy interferes with placental development, reflecting the reduction in the number and weight of newborns.

Keywords: enrofloxacin, pregnancy, placental development, immunohistochemistry, reproduction.

1. Introdução

Fluoroquinolonas são agentes antibacterianos que têm um amplo espectro de atividades contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, utilizados tanto na medicina humana, como na veterinária (Abd-Allah *et al.*, 2000). Apesar de serem geralmente bem toleradas, efeitos adversos têm sido relatados tais como: vômito, diarreia, tonturas, dor de cabeça, insônia e fototoxicidade (Owens e Ambrose, 2005). Somando-se a esses sintomas, algumas fluoroquinolonas tais como: ciprofloxacina, pefloxacina, DW-16 e moxifloxacina podem causar danos na matriz de tecidos conjuntivos como das cartilagens e tendões (Van der Linden *et al.*, 2003), além de cardiotoxicidade e alterações no sistema nervoso central (Kim *et al.*, 2000, 2003). Estes efeitos colaterais resultaram na restrição dessas fluoroquinolonas em crianças e mulheres grávidas (Shehata e Nelson-Piercy, 2001).

A enrofloxacina (1-ciclopropil-7-(etil-1-piperazinil)-6-fluoro-1, 4-dihidro-4-oxo-3-ácido quinolona-carboxílico), é uma fluoroquinolona, desenvolvida apenas para uso em animais (Elmas *et al.*, 2001), sendo indicada especialmente para tratamento de infecções respiratórias, gastrointestinais, urinárias, piodermatites, otites entre outros processos infecciosos (Marín *et al.*, 2007). Parte da atividade antimicrobiana da enrofloxacina é atribuída ao seu metabólito principal, a ciprofloxacina (Otero *et al.*, 2001).

Alguns estudos têm mostrado efeitos tóxicos da enrofloxacina em diversos tecidos. Lim *et al.* (2008) relataram inibição da proliferação celular, indução da apoptose e fragmentação do DNA em células do tendão e condrócitos em cães e cavalos. Minta *et al.* (2005) evidenciaram *in vitro* citotoxicidade da enrofloxacina em células do mesencéfalo em ratos. Esse efeito tóxico da enrofloxacina, semelhantemente às outras fluoroquinolonas, pode ser devido à tendência de se acumular como resíduo em vários tecidos e órgãos tais como: músculo, intestino, nódulos linfáticos, fígado, rins e útero, provocando muitas vezes toxicidade (Lemus *et al.*, 2008).

Na reprodução alguns estudos também têm mostrado efeitos adversos da enrofloxacina. Aral *et al.* (2008) administrando enrofloxacina na dosagem de 150mg/kg/dia durante quinze dias em ratos machos observou redução da quantidade e mobilidade dos espermatozoides, anormalidades morfológicas no epidídimo, além de danos estruturais no tecido dos testículos. Em estudo recente Lemus *et al.* (2009) demonstraram ainda que a enrofloxacina e ciprofloxacina podem provocar a mortalidade de embriões de aves, pelo fato de interferir no teor de vitelo e no desenvolvimento do saco vitelino. No entanto, não há relatos da ação desse

fármaco sobre desenvolvimento da toxicidade quando administrado durante a prenhez em mamíferos, principalmente em relação à formação da placenta.

Crescimento e desenvolvimento da placenta são cruciais para o feto, e uma alteração nestes processos podem estar intimamente relacionados com a deficiência no desenvolvimento fetal (Katayama *et al.*, 2002). Em camundongos e ratos, várias substâncias tóxicas podem induzir o desenvolvimento excessivo da apoptose placentária e prejudicar o crescimento fetal (Thota *et al.*, 2005). Assim, testamos a hipótese se a enrofloxacinina administrada durante o período gestacional, pode interferir no desenvolvimento placentário. Dessa forma, avaliamos histologicamente, morfometricamente e imunohistoquimicamente os sítios de implantação do corno uterino das ratas com sete dias de prenhez e as placentas aos quatorze e vinte dias de gestação.

2 . Material e métodos

2.1 Animais e grupos experimentais

Este trabalho foi realizado na UFRPE no Laboratório de Histologia, o qual foi submetido ao Comitê de Ética para aprovação pelo processo de número: 23082.010602/2010. Para tanto, foram utilizadas 40 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 aproximadamente 22°C 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 20 animais a saber: Grupo I - ratas prenhes sem tratamento, e Grupo II - ratas prenhes tratadas com enrofloxacinina. 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 espermatozóides nos esfregaços.

2.2. Exame colpocitológico

Para a coleta do material vaginal das ratas, 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 para possível observação dos espermatozóides caso as ratas tenham acasalado.

2.3. Tratamento com enrofloxacina

Os animais do grupo II foram submetidos ao tratamento antimicrobiano, utilizando-se o Baytril[®] (enrofloxacina), na dosagem padrão de 5,0 mg/kg a cada 24 horas, via intramuscular, por um período de sete, quatorze e vinte e um dias. O grupo I recebeu solução fisiológica na mesma dosagem por via intramuscular (Elmas *et al.*, 2007).

2.4. Análise morfológica

2.4.1. Número de embriões implantados e análise das placentas

Cinco fêmeas do grupo I e cinco do grupo II foram eutanasiadas no sétimo, décimo quarto e vigésimo dia de prenhez, para análise dos sítios de implantação e das placentas. Para tanto, as fêmeas foram anestesiadas com hidrocloreto de cetamina (80mg/kg) e xilazina (6mg/kg), por via intramuscular (Andrade, 2002). A seguir, foi realizada a abertura da cavidade abdominal para 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”. A seguir, 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 (coloração das fibras colágenas), Orceína nítrica (coloração das fibras elásticas), Impregnação argêntica (coloração das fibras reticulares) e analisados em microscópio de luz, da marca OLYMPUS BX-49 e fotografados em fotomicroscópio OLYMPUS BX-50.

2.4.2. Análise morfométrica das placentas aos 14^o e 20^o dia de prenhez

Para análise morfométrica, 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 grátícula 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 quinze campos por região placentária escolhidos aleatoriamente.

2.5. 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.

2.6. 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

O teste TUNEL foi utilizado para detectar a ocorrência de apoptose pela fragmentação do DNA. Três lâminas silanizadas contendo cortes de sítio de implantação e placentas com 14 e 20 dias de desenvolvimento, de cada grupo, foram desparafinadas e hidratadas e logo em seguida foram incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente em 30 mM Tris/HCl (pH 7.8). A incubação continuou 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 (30mM Tris/HCl, pH 7.2), 140nM de cacodilato de sódio e 1mM de cloreto de cobalto) e então colocadas em câmara úmida por 60 minutos a 37° C com tampão A contendo 0.2U/L deoxinucleotidil transferase terminal (TdT) e 15M biotina-16-dUTP. A reação foi então interrompida por uma lavagem de 15 minutos em tampão citrato (300nM de NaCl 30mM 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 e montados em tampão glicerol contendo fenilenediamina para reduzir a autofluorescência do material (Gavrieli *et al.*, 1992). Em seguida, os cortes foram observados em microscópio óptico de epifluorescência e fotografados.

3. Resultados

3.1 Contagem e histologia dos sítios de implantação

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

Os sítios de implantação nas ratas do grupo controle 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 no grupo controle apresentou-se característico do tipo simples colunar e na decídua foram visualizadas várias glândulas endometriais (Fig. 1A, 1B, 1C e 1D). Os sítios de implantação no grupo tratado apresentaram as mesmas características histológicas do controle (Fig. 2A, 2B, 2C e 2D).

3.2. Peso, análise histológica e histoquímica das Placentas

Houve uma redução estatisticamente significativa no peso das placentas das ratas tratadas com enrofloxacina, tanto aos quatorze como aos vinte dias de desenvolvimento, quando comparada as dos animais do grupo controle (Tab.2).

Na análise morfológica das placentas, com quatorze e vinte dias de desenvolvimento, dos grupos experimentais não mostraram alterações histológicas significativas, caracterizando-se pela observação 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 numerosas 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 (Fig.3A, 3B, 3C, 3D).

A análise histoquímica não revelou alterações significativas no teor de fibras colágenas, elásticas e reticulares (Tab.3).

3.3. Análise morfométrica das placentas

A análise estatística das médias da área total do disco placentário mostrou que os animais do grupo II apresentaram as menores médias, tanto aos quatorze como aos vinte dias de prenhez, diferindo significativamente do grupo controle (Tab.4). Nesse grupo também foram evidenciadas diferenças significativas na região do labirinto para os parâmetros trofoblastos sinciciais, e vascularização materna e fetal (Tab.5). Na camada de trofospongio, a média das células trofoblásticas e trofoblastos sinciciais também foram menores em relação ao controle, diferindo significativamente (Tab.6).

3.4. Apoptose

O teste de TUNEL mostrou atividade apoptótica mais intensa apenas nas placentas com 14 dias de desenvolvimento do grupo tratado em relação ao controle (Fig. 4, 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 enrofloxacina em relação ao controle, porém sem afetar o seu comprimento (Tab,7).

4. Discussão

A implantação embrionária é o processo pelo qual o embrião sob a forma de 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, 2004). O uso de medicamentos na gestação merece especial atenção pelos riscos potenciais ao feto em desenvolvimento, devendo ser, por princípio, evitado (De Jong-Van *et al.*, 1993).

Os resultados mostraram uma diminuição significativa no número de sítios de implantação nas ratas tratadas com enrofloxacina na dosagem de 5mg/kg durante os sete primeiros dias de gestação em relação ao grupo controle. Durante o período da implantação, o blastocisto parece ser muito sensível a ações de substâncias químicas, resultando muitas vezes na morte do mesmo (Kim *et al.*, 2003). Isto sugere que a enrofloxacina, pode ter tido uma ação embriocida, reduzindo consideravelmente o número de neonatos, semelhante às

fluoroquinolonas DW -16 e norfloxacina, que quando administradas em altas dosagens (500mg/kg e 400mg/kg, respectivamente) em ratas (Kim *et al.*, 2000) e macacas (Corrado *et al.*, 1987) produziram perda de embriões.

A redução do peso, área total e constituintes das placentas com 14 e 20 dias de desenvolvimento, observado nas fêmeas do grupo tratado, pode estar relacionado ao fato de que as fluoroquinolonas pode produzir um retardo no crescimento uterino (Kim *et al.*, 2000) ou ainda, promover a diminuição na ingestão de alimentos (Kim *et al.*, 2000). De uma forma ou de outra, mesmo não havendo malformação, houve um reflexo no peso da prole em decorrência dessas alterações, pois nos mamíferos a implantação é considerada o ponto crítico da gravidez, onde o sucesso da gestação requer o desenvolvimento normal de uma interação sincronizada entre o endométrio e o blastocisto (Cross *et al.*, 1994), permitindo dessa forma o desenvolvimento fetal normal (Weissbluth e Bakos, 1992).

O aumento do índice apoptótico das células da placenta, como o trofoblasto, pode afetar sua função placentária resultando em gestações complicadas (Smith *et al.*, 1999), levando, por exemplo, em humanos ao retardo do crescimento uterino e ao aumento de aborto espontâneo no primeiro trimestre de gravidez (Kokawa *et al.*, 1998). Em camundongos e ratos, várias substâncias tóxicas podem induzir a apoptose placentária excessiva bem como prejudicar o crescimento fetal (Thota *et al.*, 2005), com por exemplo as fluoroquinolonas que agem inibindo as enzimas que são fundamentais para replicação e transcrição do DNA, promovendo assim, a morte celular (Bhanot *et al.*, 2001). Além disso, análise imunohistoquímica da apoptose em placenta de vacas com 4, 6 e 9 meses de gestação mostraram que a apoptose estava presente em todas os períodos gestacionais estudados, sendo maior no grupo com nove meses de gestação indicando que a via apoptótica é mais ativa durante a maturação placentária (Meça *et al.*, 2011). Isso poderia explicar a atividade apoptótica mais intensa observada apenas nas placentas com 14 dias de desenvolvimento, período de maturação placentária nos roedores (Caluwaerts *et al.*, 2005).

A análise histoquímica revelou que não houve alterações significativas no teor de fibras colágenas, elásticas e reticulares. Isto pode estar associado a dosagem utilizada neste experimento, visto que em doses elevadas (superiores a 30 mg/Kg) algumas fluoroquinolonas causam degradação dos constituintes fibrosos da matriz extracelular dos tendões, devido a quelação do magnésio que alteraria as proteínas dos tendões, principalmente o colágeno a elastina e a fibronectina (Tolentino e Vidal 2010).

5. Conclusão

A enrofloxacinina administrada na dosagem de 5mg/kg durante prenhez em ratas interfere no desenvolvimento placentário, por alterar os elementos constituintes da placenta e aumentar a apoptose no terço médio da gestação, tendo como reflexo a redução no número e peso dos neonatos, sem alterar, no entanto, os sítios de implantação quando administrada durante os sete primeiros dias de prenhez,.

Tabela 1: *Médias e desvio padrão do número de sítios de implantação nos grupos experimentais.

GI	GII	F ^P
13,60 ± 2,07a	10,40 ± 1,51b	2,182 ^{0,0159}

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

Tabela 2: *Médias e desvio padrão do peso(g) das placentas aos 14 e 20 dias de prenhez das ratas dos grupos experimentais.

DIAS	GI	GII	F ^P
14	0,301 ± 0,018a	0,216 ± 0,059b	1,430 ^{0,0079}
20	0,650 ± 0,070a	0,503 ± 0,044b	2,765 ^{0,0111}

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

Tabela 3: Histoquímica do sítio de implantação e disco placentário (14 e 20 dias) nos grupos experimentais. Reação intensa (++), moderada (\pm) e fraca (+).

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

Tabela 4: *Médias e desvio padrão da área (μm^2) total do disco placentário aos 14 e 20 dias de prenhez das ratas dos grupos experimentais.

DIAS	GI	GII	F ^P
14	3754,98 \pm 18,65a	2487,66 \pm 12,43b	5,270 ^{0,0354}
20	5845,50 \pm 17,71a	3143,09 \pm 14,05b	1,584 ^{0,0160}

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

Tabela 5: *Médias e desvio padrão dos elementos constituintes da região do labirinto do disco placentário, com 14 dias de desenvolvimento, nos grupos experimentais.

DIAS		GI	GII	F ^P
14	VM	16,55 ± 1,21a	14,98 ± 1,09b	3,363 ^{0,0205}
	VF	13,22 ± 1,73a	11,00 ± 0,80b	2,546 ^{0,0044}
	TS	63,11 ± 1,32a	58,67 ± 2,19b	5,112 ^{0,0441}
20	VM	22,86 ± 0,37a	18,94 ± 1,09b	1,854 ^{0,0276}
	VF	18,99 ± 1,11a	16,45 ± 0,65b	2,111 ^{0,0464}
	TS	70,73 ± 1,06a	67,18 ± 2,35b	4,197 ^{0,0342}

*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 6: *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.

DIAS		GI	GII	F ^P
14	CT	45,22 ± 1,56a	41,02 ± 1,92b	1,845 ^{0,0122}
	TS	8,44 ± 0,83a	6,27 ± 0,47b	4,132 ^{0,0498}
	CTG	68,85 ± 1,84a	63,68 ± 2,77b	5,511 ^{0,0483}
20	CT	57,19 ± 1,94a	54,99 ± 1,26b	2,303 ^{0,0295}
	TS	16,69 ± 1,53a	14,01 ± 1,08b	1,756 ^{0,0374}
	CTG	75,39 ± 1,64a	72,15 ± 2,33b	4,197 ^{0,0243}

*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 7: *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	12,00 ± 1,58a	9,20 ± 1,78b	1,543 ^{0,0211}
Peso	7,65 ± 0,28a	6,54 ± 0,38b	4,113 ^{0,0015}
Comprimento	6,70 ± 0,24a	6,56 ± 0,26a	1,001 ^{0,0096}

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

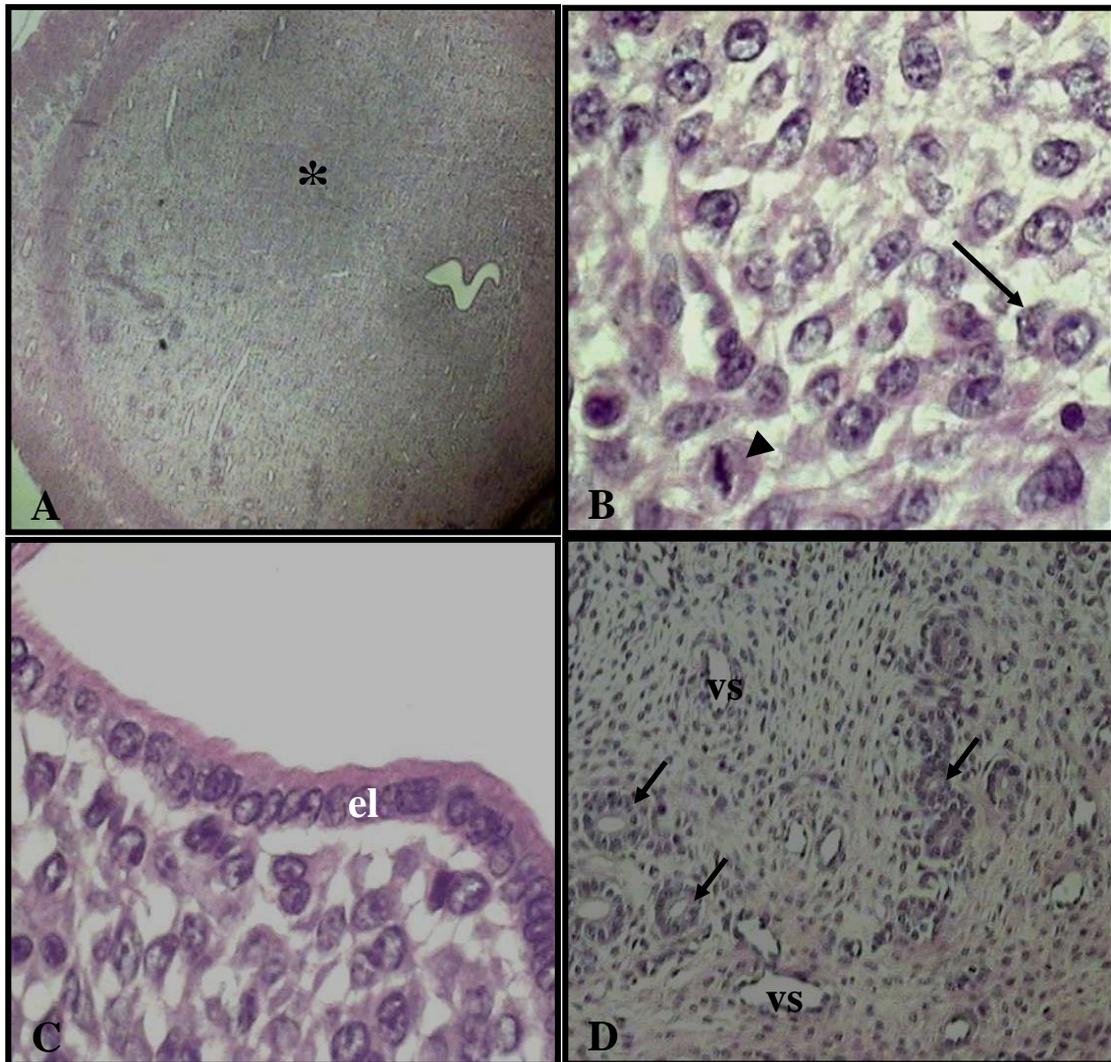


Figura 1: Fotomicrografia do sítio de implantação de ratas do grupo controle. A - Sítio de implantação (*) totalmente inserido na parede do útero. H.E. \pm 42X. B - Trofoblasto em mitose (ponta de seta) e citotrofoblasto poliplóide (seta). H.E \pm 428X. C - Epitélio luminal (el). H.E \pm 428X. D - Vasos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

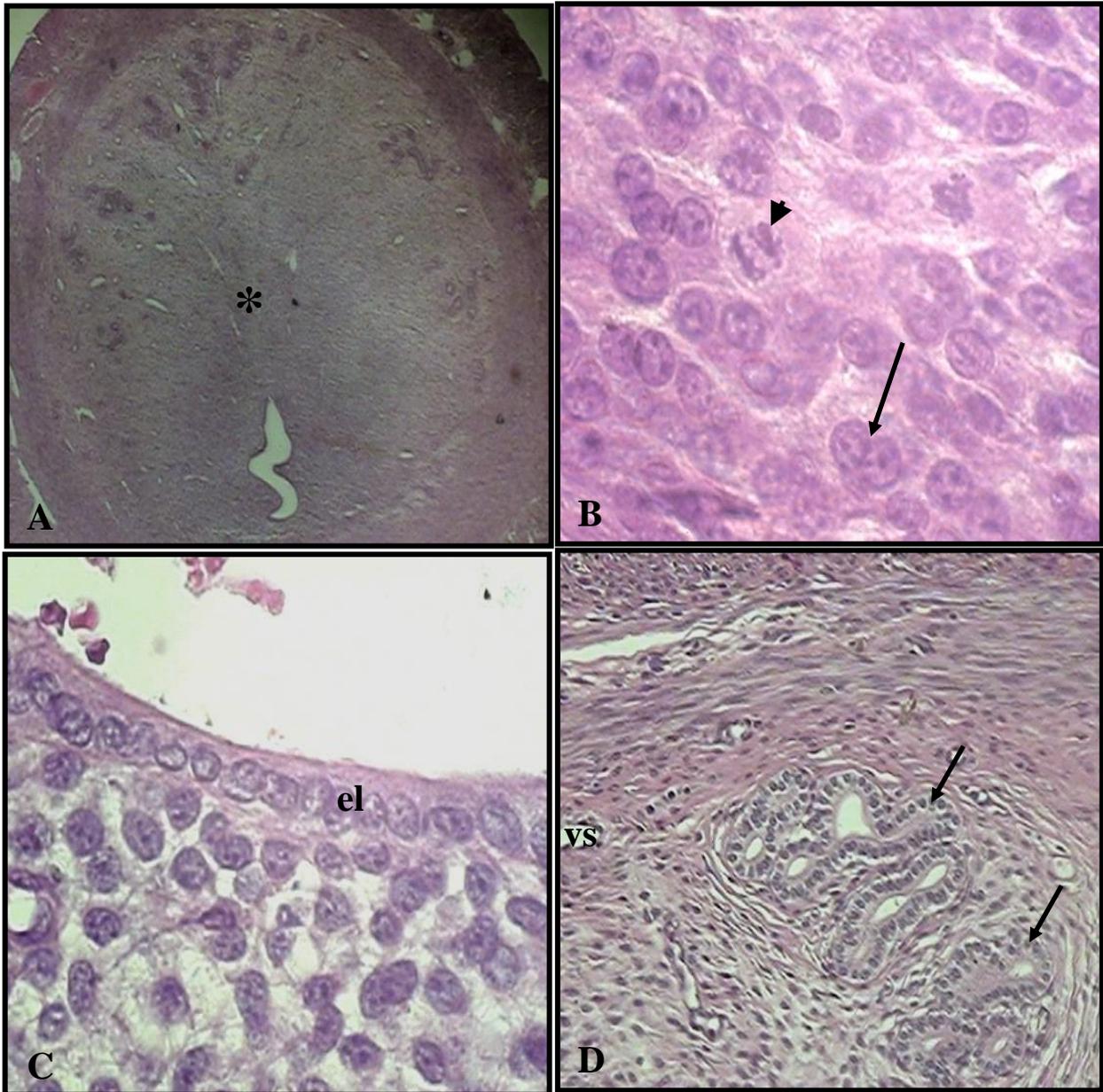


Figura 2: Fotomicrografia do sítio de implantação de ratas tratadas com enrofloxacina durante os sete primeiros dias de gestação. A - Sítio de implantação (*) totalmente inserido na parede do útero. H.E. \pm 42X. B - Trofoblasto em mitose (ponta de seta) e citotrofoblasto poliplóide (seta). H.E \pm 428X.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

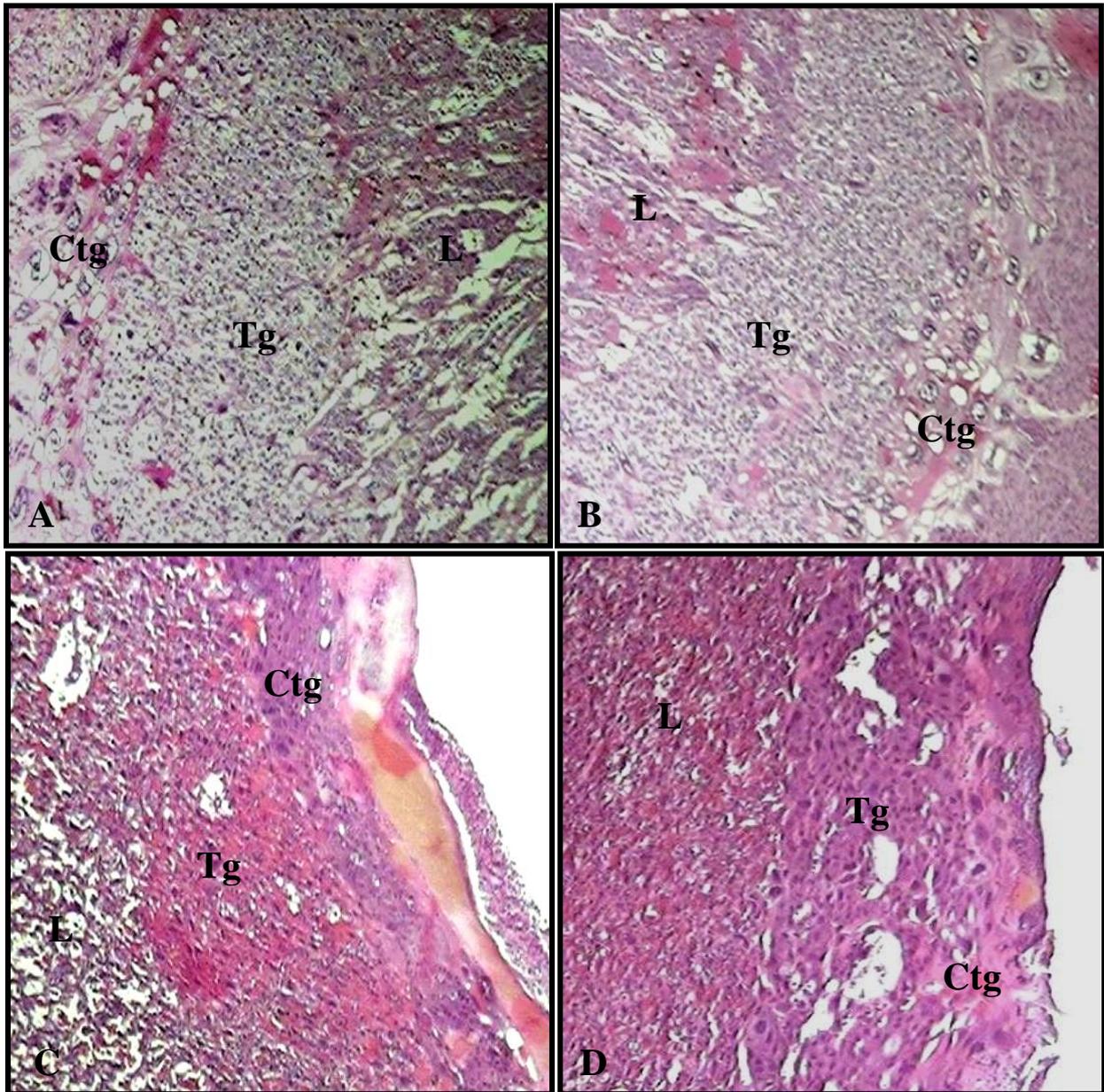


Figura 3: Fotomicrografia das placentas com 14 e 20 dias de gestação mostrando as regiões do disco placentário. Disco placentário de rata do grupo controle (A) e tratado (B) com 14 dias de desenvolvimento: labirinto (L), trofospongio (Tg) e Célula trofoblástica gigante (CTg). H.E. 107X. Disco placentário de rata do grupo controle (C) e tratado (D) com 20 dias de desenvolvimento: labirinto (L), trofospongio (Tg) e Célula trofoblástica gigante (CTg). H.E. 107X.

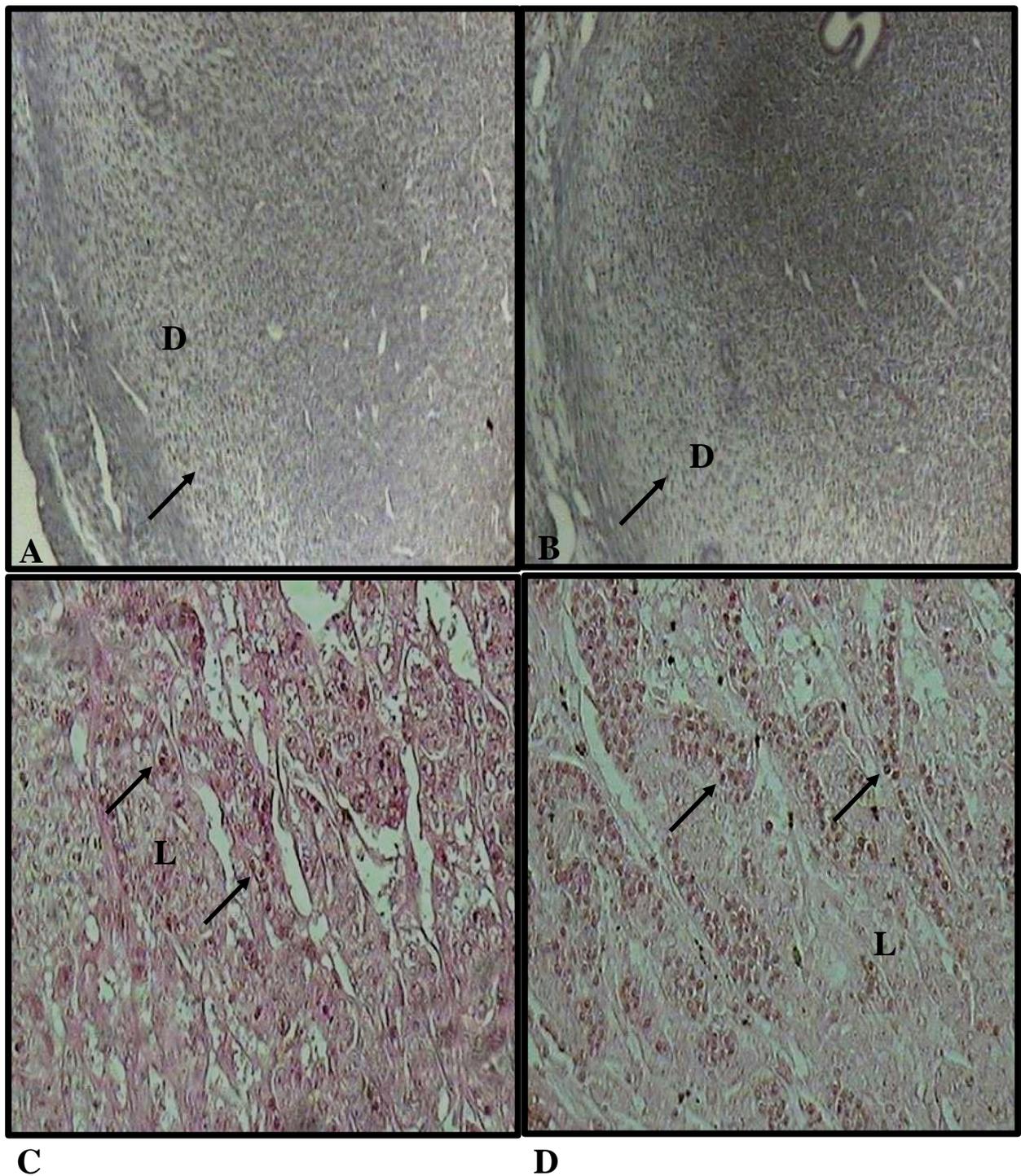


Figura 4: Fotomicrografia de células apoptóticas nos sítios de implantação e nas placentas com 14 dias de gestação, utilização do Teste de TUNEL. Sítio de implantação (A) controle e (B) tratado. Observar marcação positiva (setas) na decídua (De). Em (C) e (D) região do labirinto (L) do disco placentário de rata do grupo controle e tratado, respectivamente. Notar reação mais intensa no grupo tratado. $\pm 107X$.

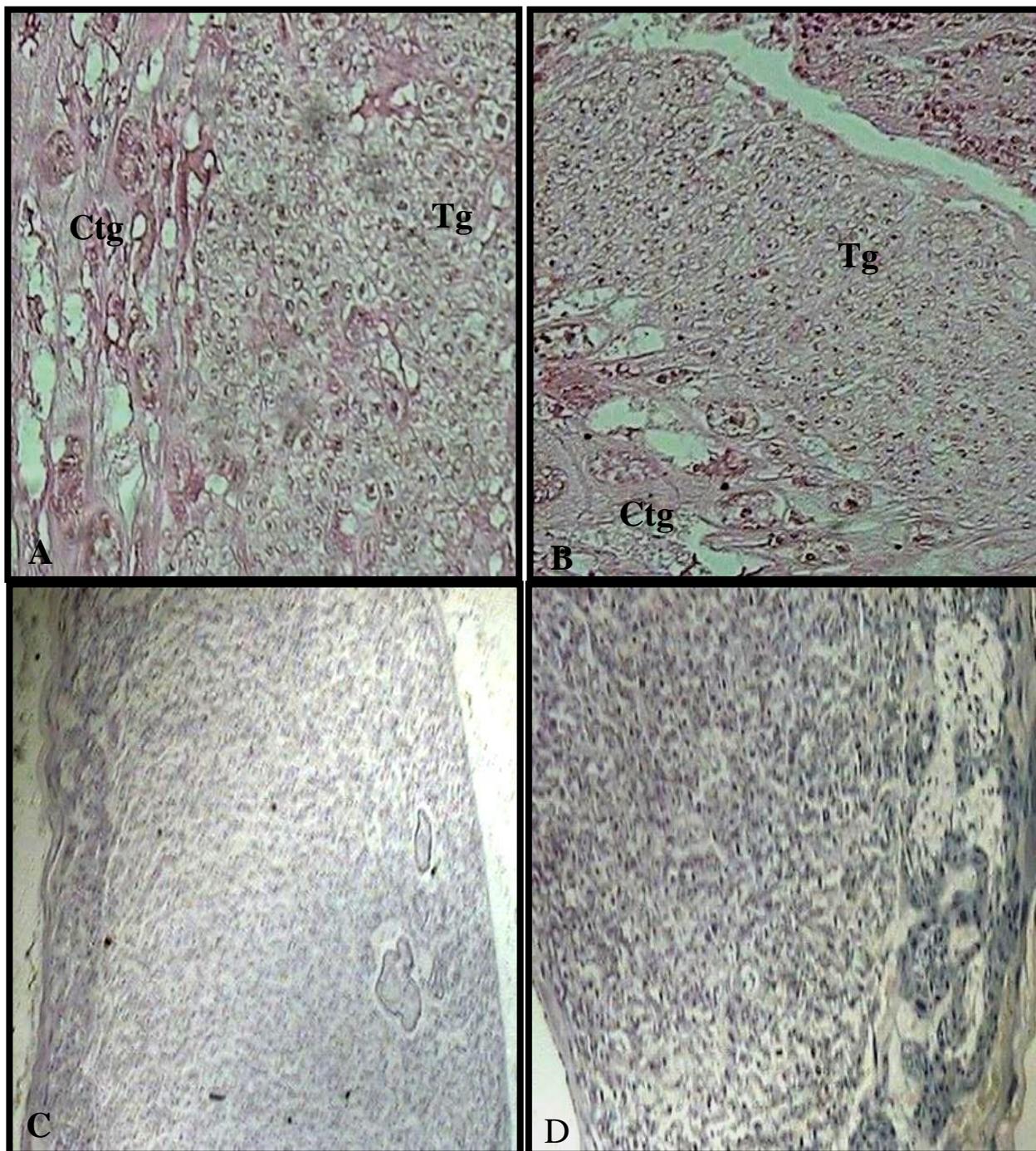


Figura 5: Fotomicrografia de células apoptóticas nas placentas com 14 dias de gestação, e ausência de marcação nas placentas de 20 dias, utilização do Teste de TUNEL. Região do trofospongio (Tg) e células trofoblásticas gigantes (Ctg) do disco placentário, com 14 dias de desenvolvimento, de ratas do grupo controle (A) e tratado (B). Observar marcação mais intensa em (B). Em (C) e (D) disco placentário com 20 dias de desenvolvimento, de rata do grupo controle e tratado, respectivamente. Notar ausência de marcação. $\pm 107X$.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa.

6. Referências

ABD-ALLAH.; A.R.A.; GANNAHAM, B.B.; HAMADA, A.M. The impact of ofloxacin on rat testicular DNA: application of image analysis. *Pharmacol. Res.*,v.42, p.145-150, 2000.

ANDRADE, A. Segurança em biotérios. In: A Andrade, SC Pinto, RS Oliveira. (orgs.). Animais de laboratório: criação e experimentação. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, p. 381 – 387, 2002.

ARAL, F.; KARACAL, F.; BABA, F. The effect of enrofloxacin on sperm quality in male mice. *Res. Vet. Sci.*, v.84, p. 95-99, 2008.

BHANOT, S.K.; SINGH, M.; CHATTERJEE, N.R. The chemical and biological aspects of fluoroquinolones: reality and dreams. *Curr. Pharm. Des.*,v.7, p.311-335, 2001.

CALUWAERTS, S.; VERCRUYSSSE, L.; LUYTEN, C, et al. Endovascular trophoblast invasion and associated structural changes in uterine spiral arteries of the pregnant rat. *Placenta.*, v.26, p. 574-584, 2005.

CORRADO, M. L.; STRUBLE, W.E.; PETER, C.; et al. Norfloxacin: review of safety studies. *Am. J. Med.*, v. 82, p.22-26, 1987.

CROSS, J.C.; WERB, Z.; FISHER, S.J. Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. *Science.*, 1994; v. 266, n. 5190, p. 1508-1518, 1994.

DE JONG-VAN DEN BERG, L.T.W.; WAARDENBURG, C.M.; HAAIJER-RUSKAMP F.M.; et al. Drug use in pregnancy: a comparative appraisal of data collecting methods. *European. J.Clin. Pharmacol.*, v. 45, p. 9-14, 1993.

ELMAS, M.; ÜNEY, K.; YAZAR, E.; et al. Pharmacokinetics of enrofloxacin following intravenous and intramuscular administration in Angora rabbits. *Res. Vet. Sci.*, v. 82, p. 242-245, 2007.

ELMAS, M.; TIRAS, B.; KAYA, S. et al. Pharmacokinetics of enrofloxacin after intravenous and intramuscular administration in angora goats were studied. *Can. J. Vet. Res.*, v. 65, p. 64-67, 2001.

GAVRIELI, Y.; SHERMAN, Y.; BEN-SASSON, S.A. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell. Biol.*, v. 119, p. 493-501, 1992.

- KATAYAMA, K.I.; UENO, M.; TAKAI, H.; et al. Ethylnitrosourea induces apoptosis and growth arrest in the trophoblastic cells of rat placenta. *Biol. Reprod.*, v. 67, p. 431-435, 2002.
- KIM, J.C.; YUN, H.I.; SHIN, H.C. et al. Embryo lethality and teratogenicity of a new fluoroquinolone antibacterial dw-116 in rats. *Archive.Toxicol.*, v.74, n.2, p. 120-124, 2000.
- KIM, J.C.; BAE, C.S.; KIM, S.H. et al. Transplacental pharmacokinetics of the new fluoroquinolone DW-116 in pregnant rats. *Toxicol. Letter.*, v. 142, n. 1-2, p. 103-109, 2003.
- KOKAWA, K.; SHIKONE, T.; NAKANO, R. Apoptosis in human chorionic villi and decidua during normal embryonic development and spontaneous abortion in the first trimester. *Placenta.*, v. 19, p. 21-26, 1998.
- LEMUS, J.A.; BLANCO, G.; GRANDE, J. et al. Antibiotics threaten wildlife: circulating quinolone residues and disease in avian scavengers. *Plos One.*, v.3, n.1, p. 144-1449, 2008.
- LEMUS, J.A.; BLANCO, G.; ARROYO, B. et al. Fatal embryo chondral damage associated with fluoroquinolones in eggs of threatened avian scavengers. *Environ. Pollut.*, v. 157, n. 8-9, p. 2421-2427, 2009.
- LIM, S.; HOSSAIN, M.A, PARK, J, et al. . The effects of enrofloxacin on canine tendon cells and chondrocytes proliferation *in vitro*. *Vet. Res. Commun.*,v.32, p. 243-253, 2008.
- MARÍN, P.; ESCUDERO, E.; FERNÁNDEZ-VARÓN, E. Pharmacokinetics and milk penetration of orbifloxacin after intravenous, subcutaneous, and intramuscular administration to lactating goats. *J. Dairy. Sci.*, v.90, n.9, p. 4219-4225, 2007.
- MEÇA, K.K.O. L.; PUERTO, H. L.D.; RODRIGUES, L.V. et al. Apoptose na maturação placentária de vacas em diferentes estágios de gestação: evidênciação imuno-histoquímica e bioquímica. *Pesqui. Vet. Bras.*,v.31,n.8, p.718-722, 2011.
- MINTA, M.; IWONA, W.; JAN Z. Inhibition of cell differentiation by quinolones in micromass cultures of rat embryonic limb bud and midbrain cells. *Toxicol. in Vitro.*,v. 19, p. 915-919, 2005.
- OTERO, J.L.; MESTORINO, N.; ERRECALDE, J.O. Enrofloxacin: una fluorquinolona de uso exclusivo em veterinaria. Parte II: farmacocinetica y toxicidad. *Anal. Vet.*,v. 21, p. 42-49, 2001.
- OWENS, R.C.J.R.; AMBROSE, P.G. Antimicrobial safety: focus on fluoroquinolones: focus on fluoroquinolones. *Clin. Infect. Dis.*, v. 15, p.144-157, 2005.
- RED-HORSE, K.; ZHOU, Y.; GENBACEV, O.; et al. Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. *J. Clin. Invest.*, v. 114, p. 744-754, 2004.
- SHEHATA, H.A.; NELSON-PIERCY, C. Drugs to avoid. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.*,v.15, p. 971-986, 2001.

SMITH, S.C.; BAKER, P.N.; SYMONDS, E.M. Placental apoptosis in normal human pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol*, v.177, p. 57-65, 1999.

THOTA, C.S.; REED, L.C.; YALLAMPALLI, C. Effects of parathyroid hormone like hormone (PTH LH) antagonist, PTH LH(7-34), on fetoplacental development and growth during midgestation in rats. *Biol Reprod*, v. 73, p. 1191-1198, 2005.

TOLENTINO, F.T.; VIDAL, B.C. Efeitos do uso de ciprofloxacina nos estados de agregação ordenada do colágeno em tendão calcâneo. XVIII Congresso Interno de Iniciação Científica da Unicamp. São Paulo, 22 a 23 de setembro de 2010.

VAN DER LINDEN, P.D.; STURKENBOOM, M.C.; HERINGS, R.M. et al. Increased risk of Achilles tendon rupture with quinolone antibacterial use, especially in elderly patients taking oral corticosteroids. *Arch. Intern. Med.*, 2003; 163(15):1801-7.

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

ANEXO

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

(Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences)

Política Editorial

O periódico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science), ISSN 0102-0935 (impresso) e 1678-4162 (on-line), é editado pela FEPMVZ Editora, CNPJ: 16.629.388/0001-24, e destina-se à publicação de artigos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal, aquacultura e áreas afins.

Os artigos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com assessoria de especialistas da área (relatores). Os artigos cujos textos necessitarem de revisões ou correções serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade do Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ABMVZ) citado como Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. São imprescindíveis originalidade, ineditismo e destinação exclusiva ao ABMVZ.

Reprodução de artigos publicados

A reprodução de qualquer artigo publicado é permitida desde que seja corretamente referenciado. Não é permitido o uso comercial dos resultados.

A submissão e tramitação dos artigos é feita exclusivamente on-line, no endereço eletrônico <www.abmvz.org.br>.

Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis nos endereços www.scielo.br/abmvz ou www.abmvz.org.br.

Orientação para tramitação de artigos

- . Toda a tramitação dos artigos é feita exclusivamente pelo Sistema de publicação online do ABMVZ no endereço www.abmvz.org.br.
- . Apenas o autor responsável pelo artigo deverá preencher a ficha de submissão, sendo necessário o cadastro do mesmo no Sistema.
- . Toda comunicação entre os diversos atores do processo de avaliação e publicação (autores, revisores e editores) será feita exclusivamente de forma eletrônica pelo Sistema, sendo o autor responsável pelo artigo informado, automaticamente, por e-mail, sobre qualquer mudança de status do artigo.
- . A submissão só se completa quando anexado o texto do artigo em Word e em pdf no campo apropriado.
- . Fotografias, desenhos e gravuras devem ser inseridas no texto e também enviadas, em separado, em arquivo com extensão jpg em alta qualidade (mínimo 300dpi), zipado, inserido no campo próprio.
- . Tabelas e gráficos não se enquadram no campo de arquivo zipado, devendo ser inseridas no corpo do artigo.
- . É de exclusiva responsabilidade de quem submete o artigo certificar-se de que cada um dos autores tenha conhecimento e concorde com a inclusão de seu nome no mesmo submetido.
- . O ABMVZ comunicará via eletrônica a cada autor, a sua participação no artigo. Caso, pelo menos um dos autores não concorde com sua participação como autor, o artigo será recusado.

Tipos de artigos aceitos para publicação:

- . Artigo científico

É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Filiação, Resumo, Abstract, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão), Conclusões, Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a 15, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 30.

. Relato de caso

Contempla principalmente as áreas médicas, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Filiação, Resumo, Abstract, Introdução, Casuística, Discussão e Conclusões (quando pertinentes), Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a 10, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 12.

. Comunicação

É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental, dignos de publicação, embora insuficientes ou inconsistentes para constituírem um artigo científico.

O texto, com título em português e em inglês, Autores e Filiação deve ser compacto, sem distinção das seções do texto especificadas para “Artigo científico”, embora seguindo aquela ordem. Quando a Comunicação for redigida em português deve conter um “Abstract” e quando redigida em inglês deve conter um “Resumo”.

O número de páginas não deve exceder a 8, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 12.

Preparação dos textos para publicação

Os artigos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal. Para ortografia em inglês recomenda-se o Webster’s Third New International Dictionary. Para ortografia em português adota-se o Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa, da Academia Brasileira de Letras.

Formatação do texto

. O texto deve ser apresentado em Microsoft Word, em formato A4, com margem 3cm

(superior, inferior, direita e esquerda), em fonte Times New Roman tamanho 12 e em espaçamento entrelinhas 1,5, em todas as páginas, com linhas numeradas.

. Não usar rodapé. Referências a empresas e produtos, por exemplo, devem vir, obrigatoriamente, entre parêntesis no corpo do texto na seguinte ordem: nome do produto, substância, empresa e país.

Seções de um artigo

. Título. Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo e não ultrapassar 150 dígitos.

. Autores e Filiação. Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com identificação da instituição a que pertencem. O autor para correspondência e seu e-mail devem ser indicados com asterisco.

Nota:

1. o texto do artigo em Word deve conter o nome dos autores e filiação.

2. o texto do artigo em pdf não deve conter o nome dos autores e filiação.

. Resumo e Abstract. Deve ser o mesmo apresentado no cadastro contendo até 2000 dígitos incluindo os espaços, em um só parágrafo. Não repetir o título e incluir os principais resultados numéricos, citando-os sem explicá-los, quando for o caso. Cada frase deve conter uma informação. Atenção especial às conclusões.

. Palavras-chave e Keywords. No máximo cinco.

. Introdução. Explicação concisa, na qual são estabelecidos brevemente o problema, sua pertinência e relevância e os objetivos do trabalho. Deve conter poucas referências, suficientes para balizá-la.

. Material e Métodos. Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Não usar subtítulos. Nos trabalhos que envolvam animais e organismos geneticamente modificados deverá constar, obrigatoriamente, o número do protocolo de aprovação do Comitê de Bioética e/ou de Biossegurança, quando for o caso.

. Resultados. Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados.

. Tabela. Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação dos cabeçalhos e no final da tabela. A legenda recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Tab., mesmo quando se referir a várias tabelas. Pode ser apresentada em espaçamento simples e fonte de tamanho menor que 12 (menor tamanho aceito é 8).

. Figura. Qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema, etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Fig., mesmo se referir a mais de uma figura. As fotografias e desenhos com alta qualidade em formato jpg, devem ser também enviadas, em um arquivo zipado, no campo próprio de submissão.

Nota:

- . Toda tabela e/ou figura que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, informação sobre a fonte (autor, autorização de uso, data) e a correspondente referência deve figurar nas Referências.
- . As tabelas e figuras devem preferencialmente, ser inseridas no texto no parágrafo seguinte à sua primeira citação.
- . Discussão. Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto a juízo do autor, sem prejudicar qualquer das partes).
- . Conclusões. As conclusões devem apoiar-se nos resultados da pesquisa executada.
- . Agradecimentos. Não obrigatório. Devem ser concisamente expressados.
- . Referências. As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética. Evitar referenciar livros e teses. Dar preferência a artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, indexadas. São adotadas as normas ABNT/NBR-6023 de 2002, adaptadas conforme exemplos:

Como referenciar:

1. Citações no texto

. Citações no texto deverão ser feitas de acordo com ABNT/NBR 10520 de 2002. A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:

- . autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88)
- . dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974)
- . mais de dois autores: (Ferguson et al., 1979) ou Ferguson et al. (1979)
- . mais de um artigo citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson et al. (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson et al., 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para artigos do mesmo ano.

. Citação de citação. Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão citado por e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Nas Referências, deve-se incluir apenas a fonte consultada.

. Comunicação pessoal. Não fazem parte das Referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

2. Periódicos (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores et al.):

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. Am. J. Vet. Res., v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general

del canino. Not. Med. Vet., n.1, p.13-20, 1984.

3. Publicação avulsa (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores et al.):

DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. Anais... São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

SOUZA, C.F.A. Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte. 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

4. Documentos eletrônicos (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores et al.):

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critca16.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more combative, organized. Miami Herald, 1994. Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerld-Summit-RelatedArticles/>>. Acessado em: 5 dez. 1994.

Nota:

. Artigos que não estejam rigorosamente dentro das normas acima não serão aceitos para avaliação.

. O Sistema reconhece, automaticamente, como “Desistência do Autor” artigos em diligência ou “Aguardando diligência do autor”, que não tenha sido respondido no prazo dado pelo Sistema.

Taxas de submissão e de publicação:

. Taxa de submissão. A taxa de submissão de R\$30,00 deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal. Somente artigos com taxa paga de submissão serão avaliados.

Caso a taxa não seja quitada em até 30 dias será considerado como desistência do autor.

. Taxa de publicação. A taxa de publicação de R\$70,00, por página impressa em preto e R\$220,00 por página impressa em cores será cobrada do autor indicado para correspondência, por ocasião da prova final do artigo. A taxa de publicação deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal.

Recursos e diligências:

. No caso de o autor encaminhar resposta a diligências solicitadas pelo ABMVZ, ou documento de recurso, o mesmo deverá constar como a(s) primeira(s) página(s) do texto do artigo somente na versão em Word.

. No caso de artigo não aceito, se o autor julgar pertinente encaminhar recurso, o mesmo deve ser feito pelo e-mail journal@vet.ufmg.br.

