

PATRICIA PILAR COSTA

**Avaliação dos possíveis efeitos embriotóxicos da  
administração do dipropionato de imidocarb no período de  
organogênese de ratos**

São Paulo  
2005

PATRICIA PILAR COSTA

**Avaliação dos possíveis efeitos embriotóxicos da  
administração do dipropionato de imidocarb no período de  
organogênese de ratos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

**Departamento:**

Patologia Experimental e Comparada

**Área de concentração:**

Patologia Experimental e Comparada

**Orientadora:**

Profa. Dra. Martha Maria Bernardi

São Paulo  
2005

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

#### DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 1460  
FMVZ

Costa, Patricia Pilar

Avaliação dos possíveis efeitos embriotóxicos da administração do dipropionato de imidocarb no período de organogênese de ratos / Patricia Pilar Costa. – São Paulo : P. P. Costa, 2005.

64 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia Experimental e Comparada, 2005.

Programa de Pós-graduação: Patologia Experimental e Comparada.  
Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Profa. Dra. Martha Maria Bernardi.

1. Dipropionato de imidocarb. 2. Teratogênese. 3. Babesiose.  
4. Ratos. 5. Equinos. I. Título.

---

## ERRATA

Página	Parágrafo	Linha	Onde se lê	Leia-se
Página de rosto	6	2	Profa. Dra. Martha Maria Bernardi	Profa. Dra. Maria Martha Bernardi

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"

*PARECER*

Interessado: Patrícia Pilar Costa

Assunto: Protocolo de experimentação adotado em experimento animal.

A Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, após analisar o projeto sob o número 354/2003, intitulado: "Avaliação dos possíveis efeitos embriotóxicos da administração do dipropionato de imidocarb no período de organogênese de ratos", no qual foram utilizados 60 ratos, sob responsabilidade da Dr<sup>a</sup> Maria Martha Bernardi, constatou que o mesmo foi realizado de acordo com os princípios de bioética, adotados por esta Comissão.

São Paulo, 27 de novembro de 2003

  
Prof.ª Dr.ª Júlia Maria Matera

Presidente da Comissão de Bioética

FMVZ/USP

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome do autor: COSTA, Patricia Pilar

Título: Avaliação dos possíveis efeitos embriotóxicos da administração do dipropionato de imidocarb no período de organogênese de ratos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_  
Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_  
Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_  
Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

## RESUMO

COSTA, P. P. **Avaliação dos possíveis efeitos embriotóxicos da administração do dipropionato de imidocarb no período de organogênese de ratos.** [Evaluation of the possible embriotoxic effects of imidocarb dipropionate administered during organogeneses in rats]. 2005. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

O dipropionato de imidocarb (D. I.) é um medicamento empregado tanto no tratamento como na profilaxia da babesiose. O objetivo com esse trabalho foi avaliar os possíveis efeitos embriotóxicos da administração do D. I. a ratas durante o período de organogênese. Para tanto, foram utilizadas sessenta ratas divididas em três grupos dois experimentais e um controle, que receberam do sexto ao décimo quinto dia de gestação por via subcutânea, duas doses terapêuticas do D. I. a de 1,7 mg/kg e a de 2,5 mg/kg e o grupo controle NaCl a 0,9%. Ambas doses não alteraram o peso e o ganho de peso materno, durante o período de administração, indicando ausência de toxicidade materna. Na dose de 2,5 mg/kg do D. I. promoveu aumento da média de peso dos filhotes por ninhada e diminuição da média de peso da placenta individual e por ninhada. Em relação à avaliação óssea e visceral não foram detectadas diferenças entre os grupos experimentais e controle. Na dose de 2,5 mg/kg do D. I. notou-se também maior maturidade da prole indicada por uma maior ossificação total e de número de esternébrios.

Palavras-chave: Dipropionato de imidocarb. Teratogênese. Babesiose. Ratos. Equinos.

## ABSTRACT

**COSTA, P. P. Evaluation of the possible embryotoxic effects of imidocarb dipropionate administered during organogeneses in rats.** [Avaliação dos possíveis efeitos embriotóxicos da administração do dipropionato de imidocarb no período de organogênese de ratos]. 2005. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

The imidocarb dipropionate (I. D.) drug is widely used in the treatment as well as in the prophylaxis of the babesiosis. The objective of this study was to investigate a possible embryotoxic effects of I. D. administered during organogenic period in rats. Sixty rats were used and divided into three groups, two experimental groups and one control group. Animals of the experimental groups received (sc), 1,7 mg/kg or 2,5 mg/kg of the I. D. from 6<sup>o</sup> to 15<sup>o</sup> days of pregnancy. The control group received only the saline solution. Results showed that both I. D. doses were unable to induce changes in the maternal weight and maternal weight gain during the treatment period, showing no maternal toxicity. At the I. D. 2,5 mg/kg dose group an increase on the fetal weight was observed by brood and a decrease on the placental weight was observed either individually or by brood. The skeletal and visceral evaluation were not modified by the prenatal exposure. However, at the I. D. 2,5 mg/kg dose an improvement in the offspring maturity was observed by an increase of the skeletal total ossification and by the number of sternebrs.

Key words: Imidocarb Dipropionate. Teratogenesis. Babesiosis. Rats. Equines.



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	8
1.1	CONSIDERAÇÕES SOBRE AS BABESIOSES EQUÍNAS.....	8
1.2	SOBRE OS MEDICAMENTOS EMPREGADOS NO TRATAMENTO DAS BABESIOSES.....	20
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	25
2.1	OBJETIVO GERAL.....	25
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	26
3.1	ANIMAIS.....	26
3.2	DROGAS.....	26
3.3	PROCEDIMENTOS.....	27
3.3.1	Avaliação do Ciclo Estral.....	27
3.3.2	Acasalamento e Diagnóstico de Prenhez.....	28
3.3.3	Laparotomia e Avaliação do Desempenho Reprodutivo Materno aos 21 Dias de Gestação.....	28
3.3.4	Análise dos Fetos aos 21 Dias de Gestação.....	29
<b>4</b>	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	31
<b>5</b>	<b>DELINEAMENTO EXPERIMENTAL</b> .....	32
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	33
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	45
<b>8</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	57
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	58

## 1 INTRODUÇÃO

Diversos grupos de ácaros são parasitas e transmissores de doenças para o homem e para os animais domésticos. Dentre eles destacam-se aqueles pertencentes à família Ixodidae, vulgarmente conhecidos como carrapatos. Neste sentido, além da inoculação de toxinas, os carrapatos podem transmitir vírus, riquetsias, bactérias e protozoários responsáveis por graves doenças (URQHART et al., 1990). A babesiose é uma doença infecciosa transmitida através da saliva do carrapato quando este realiza o repasto sanguíneo (PHIPPS, 1996). Ao se realizar o exame clínico de um animal enfermo são observados os seguintes sinais e sintomas: hipertermia, anorexia, depressão, incoordenação, fraqueza, anemia, icterícia, hemoglobinemia e hemoglobinúria (RISTIC; KREIER, 1981).

### 1.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE AS BABESIOSES EQUINAS

A Babesiose é causada pela *Babesia*, protozoário pertencente à classe Piroplasmida, subfilo Sporozoa. Em bovinos têm-se diferentes espécies de *Babesia*, a *Babesia bigemina*, *Babesia bovis*, *Babesia divergens*, *Babesia major*; em ovinos encontra-se *Babesia motasi*, *Babesia ovis*; em suínos, *Babesia trautmanni*, *Babesia perroncitoi*; em cães, *Babesia canis*, *Babesia gibsoni*; em gatos, *Babesia felis* e em cavalos ocorrem duas espécies, *Babesia caballi* e *Babesia equi*, estas últimas de grande importância na equinocultura (URQHART et al., 1990). A *B. equi*, diferentemente de outras babesias, apresenta desenvolvimento em linfócitos antes do

ciclo nos eritrócitos (abaixo descrito), semelhante à espécie *Theileria* (BRÜNING, 1996; PHIPPS, 1996). A babesiose eqüina também pode ser conhecida como: piroplasmose, nutalliose e febre do Texas (LEVINE, 1985). Ela representa a parasitose de maior importância na eqüinocultura, determinando tanto prejuízos diretos, que vão desde a queda na performance até a morte dos animais, quanto indiretos, que dizem respeito à restrição de comercialização e trânsito de eqüinos soropositivos em alguns países (CUNHA et al., 1998; BRÜNING, 1996).

A *Babesia equi*, a menor, e a *Babesia caballi*, a maior, podem acometer eqüinos e asininos, e são encontradas nas Américas, África, Ásia e continente europeu. Ambas são transmitidas por uma gama de espécies de carrapatos, incluídos os gêneros *Dermacentor*, *Hyalomma* e *Rhipicephalus* (URQHART et al., 1990). Entretanto, existem regiões que apesar de não apresentarem os vetores da babesiose eqüina, como por exemplo o Rio Grande do Sul, são consideradas endêmicas. Tal fato torna clara a existência de lacunas no que se refere à epizootiologia da enfermidade (CUNHA et al., 1996; RIBEIRO et al., 1995).

A babesia é um protozoário parasita intra-eritrocitário de animais domésticos e selvagens. No caso da *Babesia caballi*, da mesma forma que em outras espécies de babesia, o ciclo no eritrócito ocorre da seguinte maneira: o trofozoita é um organismo circular ou elíptico, de 1-1,5 µm de diâmetro e com um núcleo; este sofre aumento de tamanho e o núcleo duplica-se para formar o trofoblasto; por brotamento ou fissão binária o trofoblasto dá origem a dois (par) organismos, piriformes e com 2-5 µm de comprimento por 1-1,5 µm de largura, que são os merozoítas; o conjunto de merozoítas recebe o nome de esquizonte; cada merozoíta continua o ciclo infectante após a destruição do eritrócito por rompimento e penetração em novo eritrócito (DE WALL; HEERDEN, 1994; SHAH-FISHER; SAY, 1989). A partir do momento em que o sangue infectado é ingerido pelo carrapato adequado, supõe-se que ocorra uma fase sexuada nas

células do intestino do carrapato, seguida por esquizogonia, resultando na produção de organismos claviformes, móveis e alongados, denominados de vermículos. Estes migram para os tecidos da fêmea do carrapato, especialmente o ovário, onde ocorre outra multiplicação produzindo mais vermículos. O processo todo leva cerca de sete dias. No ovário da fêmea do carrapato os vermículos invadem os ovos e, subseqüentemente, continuam a se multiplicar nos tecidos das larvas eclodidas. Quando as larvas se alimentam pela primeira vez, os vermículos entram nos ácinos salivares e formam, em poucos dias, os esporozoítas infectantes. Estes esporozoítas são liberados no lúmen da glândula salivar, são ovais ou piriformes e com 2,5-3  $\mu\text{m}$  de extensão, e são inoculados no novo hospedeiro antes do término da alimentação. A transmissão transovariana assegura que as babesias sejam transmitidas por estádios da geração seguinte de carrapato (DE WALL; HEERDEN, 1994; URQHART et al., 1990). A infecção pela *Babesia caballi* ocorre pelos carrapatos dos gêneros *Dermacentor* e *Hyalomma* e a transmissão ocorre da fêmea do carrapato para a progênie através da via transovariana. Todos os estádios da prole sucedente são capazes de transmitir o agente aos eqüídeos (LEVINE, 1985; RIBEIRO et al., 1995; SHAH-FISHER; SAY, 1989).

Como citado no caso da *Babesia equi*, diferentemente das outras espécies de *babesia spp*, esta aparentemente apresenta um ciclo de esquizogonia em linfócitos do hospedeiro vertebrado. A formação dos merozoítas nos linfócitos ocorre em doze a quatorze dias após a infestação de animais susceptíveis por carrapatos infectados, sendo então liberados para invadir os eritrócitos. O estagio intra-eritrocitário inclui o trofozoíta que pode ser oval, redondo, elíptico ou alongado e com 3  $\mu\text{m}$  de diâmetro, processos de divisão (brotamento ou fissão binária) e formação dos merozoítas. O merozoíta apresenta-se mais freqüentemente na forma piriforme, com 1,5  $\mu\text{m}$  de extensão e em número de quatro no eritrócito, arranjo semelhante à Cruz de Malta. O

desenvolvimento no carrapato vetor se processa da seguinte maneira: no oitavo dia após a ninfa do carrapato se alimentar, esporontes são achados na glândula salivar; eles permanecem sem alteração nessa glândula durante a muda de ninfa para adulto; a maturação dos esporozoítas não começa até que o carrapato adulto infectado infeste o hospedeiro vertebrado; após isso o processo é completado dentro de cinco dias. O esporozoíta da *B. equi* apresenta 3-3,4 µm de comprimento (DE WALL; HEERDEN,1994). A transmissão transestadial permite que ao iniciar-se a alimentação do próximo estágio da fêmea do carrapato, os vermículos atinjam as glândulas salivares e amadureçam, transformando-se em formas infectantes (URQHART et al., 1990). A infecção pela *Babesia equi* ocorre pelos carrapatos do gênero *Rhipicephalus* e a transmissão ocorre de estágio para estágio. Adultos, larvas e ninfas que se alimentam em um cavalo infectado podem então infectar outro cavalo (LEVINE, 1985; SHAH-FISHER; SAY, 1989).

É estimado que somente 10% da população total mundial de equinos habitem regiões livres de babesiose. No Brasil, que possui 5,8 milhões de animais, não existe região estudada indene para esta doença (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2002). Muitas áreas, correntemente livres da babesiose equina, são climaticamente apropriadas para o carrapato vetor ou já possuem o vetor. Existe, portanto, um constante perigo de introduzir organismos patogênicos em áreas não contaminadas através do comércio de cavalos e, especialmente, pelo esporte equestre. Este perigo pode resultar em sérios prejuízos econômicos, envolvendo espécimes valiosos em torneios de cavalos. Animais infectados tornam-se portadores por anos, e a potencial infecção uterina do concepto pode ocorrer do começo ao fim da gestação (DE WALL, 1992). Esse conjunto de fatores vem contribuindo para sérias implicações econômicas na criação de cavalos em todo o mundo e especialmente no Brasil onde, com a

crescente expansão de criação de eqüídeos, observou-se um aumento do número de casos clínicos de babesiose, demonstrando a real importância desta doença (RIBEIRO et al., 1995).

O Brasil é uma área endêmica para ambas as babesias, a *Babesia equi* e a *Babesia caballi*. No Rio de Janeiro, 90,6-100% dos cavalos encontram-se infectados por *B. equi* e 59,4-65,5% por *B. caballi*. Em potros, a incidência de anticorpos é de 100% na idade de 127 dias e 150 dias para *B. equi* e *B. caballi*, respectivamente. Anticorpos maternos podem ser encontrados em potros de até quatro meses de idade. Os cavalos apresentam-se infestados com cinco a mais de cem carrapatos. Desses, são identificados *Amblyomma cajenense* e *Anocentor nitens*, ambos possíveis vetores de *B. caballi*. Os *An. nitens* apresentam na hemolinfa, ovário e ovos, vermículos do parasito. Os cavalos infectados pela *B. equi* freqüentemente encontram-se parasitados pelo *Boophilus microoplus*, no entanto, este carrapato nunca foi comprovado como infectado por *B. equi*. Futuras pesquisas são necessárias para tornar claro este fenômeno, pois o vetor da *B. equi*, no América do Sul, permanece desconhecido (BARBOSA et al., 1995; RIBEIRO et al., 1995).

Na região de São Paulo, 49,2% dos cavalos encontram-se infectados por *B. equi* e 79,4% por *B. caballi*. Em potros, a incidência de anticorpos é de 36% aos doze meses para *B. equi* e de 100% aos dez meses de idade, para *B. caballi*. Anticorpos maternos contra *B. equi* podem ser encontrados em potros de até cinco meses e contra *B. caballi*, em potros de até 4 meses de idade. Os cavalos apresentam-se infestados por *Dermacentor nitens*, *Amblyomma cajennense* e *Boophilus microoplus*. Em fazendas de criação intensiva somente o vetor *D. nitens* é encontrado. Por outro lado, em fazendas de criação extensiva, onde cavalos têm contato direto ou indireto com bovinos, é encontrado o vetor *B. microoplus*, ocorrendo uma maior incidência de *B. equi* nesses animais. Isso pode indicar possíveis evidências epidemiológicas da transmissão da *B. equi* por *B. microoplus*. Prevalece a infecção por *B. caballi* sobre a *B. equi* em São Paulo, o que

contrasta com os dados coletados no Rio de Janeiro. Isto demonstra uma diferença epidemiológica entre as duas regiões, que envolve variação climática, modelo de criação animal e incidência de vetores e indica que, no Brasil, o sistema de transmissão de ambas as espécies de *Babesia* é muito potente e o vetor abundante (HEUCHERT et al., 1999).

Mamíferos são geralmente susceptíveis ao parasito, mas a susceptibilidade aos seus efeitos é variável. Em geral, raças locais estão melhor adaptadas ao clima e alimentação. Fatores que aumentam a susceptibilidade ou debilitam as defesas devem ser considerados como determinantes de receptividade. A condição fisiológica do animal influencia o mecanismo de defesa natural ou adquirida e qualquer dano da condição do animal como fadiga, problemas nutricionais, desvio metabólico (lactação, gestação) e doenças, aumenta o número de animais susceptíveis à primo-infecção ou reincidência (SHAH-FISHER; SAY, 1989).

A recuperação de uma infecção é o resultado de uma resposta imune que freia a manifestação existente de sinais clínicos e bloqueia seu desenvolvimento durante uma recidiva ou subsequente reinfecção. No caso da babesia a imunidade ativamente adquirida é mantida por vários anos, enquanto persistir o parasita. Entretanto, a defesa imunológica, neste caso, não oferece imunidade que leva à esterilização, ou seja, à eliminação de todos os parasitas do indivíduo e nem mesmo previne reinfecção, especialmente por causa das cepas antigênicamente diferentes. Um quadro clínico inicial é seguido por uma série de recidivas que vão diminuindo de severidade e apresentam aumento de intervalo; eles finalmente tornam-se subclínicos e passam despercebidos. Quando se observam reincidências atribuem-nas à variação antigênica (SHAH-FISHER; SAY, 1989).

A atividade de premunicação pode ser desenvolvida em outras circunstâncias além da doença primária. Animais jovens, nascidos em uma área endêmica de mães com pré-imunização, recebem anticorpos através do colostro, os quais persistem até dois a três meses. Isto confere premunicação passiva. No desenvolvimento, estes animais jovens têm uma alta probabilidade de serem infestados por carrapatos infectantes, durante o primeiro mês de vida. Na maioria dos casos, eles superam a primeira infecção sem sinais clínicos óbvios e desenvolvem sua própria imunidade (SHAH-FISHER; SAY, 1989). As primeiras hemácias parasitadas são observadas em 13% dos potros na primeira semana de vida e 80,3% deles sofrem infecção antes de quarenta e dois dias de idade. A estação de parição das éguas coincide com a época de infestações das pastagens com instares de *D. nitens* e *A. cajennense*, proporcionando condições para que os potros sejam infectados nos primeiros dias de vida (RIBEIRO et al., 1995).

Segundo Cunha, 1996, nenhuma variação significativa estatisticamente é detectada no título de anticorpos de animais de diferentes faixas etárias e sexos, com exceção de títulos de éguas gestantes que tendem a ser significativamente mais baixos que os de potros.

Diferenças imunológicas podem ser demonstradas entre cepas de uma única espécie de Babesia, mas de diferente origem geográfica. A diferença também se aplica a patogenicidade (KUTTLER; ZAUGG; GIPSON, 1987; SHAH-FISHER; SAY, 1989).

Variações antigênicas apresentam-se a cada recidiva seguinte a uma infecção clínica primária; recidivas ocorrem como resultado da produção de novas variações antigênicas que não correspondem aos anticorpos estabelecidos. Cada mudança do antígeno específico anula a efetividade da resposta imune imediata do hospedeiro (pois os anticorpos já não conseguem atuar da maneira adequada) enquanto novos anticorpos apropriados são formados. A variação



antigênica é consequência da pressão seletiva, devido à atividade do anticorpo do hospedeiro. Ocorre uma variação da estrutura molecular do antígeno. A capacidade de variação antigênica da babesia determina a infecção crônica, este é o mecanismo que permite a propagação da doença por vários anos (SHAH-FISHER; SAY, 1989).

A babesiose eqüina, hoje em dia, sem dúvida, representa uma das principais enfermidades que acometem eqüinos de esporte, pois determina queda de performance dos animais justamente quando estes são preparados para competições (CUNHA et al., 1996). O estresse provocado pelos treinamentos induz à reagudização de parasitemias com desenvolvimento de estados anemiantes que diminuem o rendimento dos animais (IBÁÑEZ; GIMENEZ; ZENOCRATI, 1979). Também na área reprodutiva a enfermidade é reconhecida como causa de reabsorções embrionárias e abortos em éguas portadoras de *Babesia spp* (CUNHA et al., 1996; DE WALL, 1992).

Segundo De Wall (1992), o período de incubação após a infecção pela *B. equi* varia de doze a dezenove dias e de dez a trinta dias para a *B. caballi*. Pela experiência dos autores a maioria dos casos clínicos é causada por *B. equi*. Infecções por *B. caballi* tendem a não ser clinicamente aparentes e são responsáveis por severa anemia e sinais típicos da babesiose. Ocasionalmente *B. caballi* causa inapetência crônica, performance diminuída, perda de peso corporal, membranas mucosas pálidas e moderada taquicardia. A esplenomegalia está frequentemente presente nestes casos.

Casos agudos de babesiose são freqüentes e caracterizados por febre ( $\geq 40^{\circ}\text{C}$ ), variados graus de anorexia, bem como padrão respiratório e pulso elevados. A febre é freqüentemente acompanhada por sudorese, congestão de mucosas e sons de palpação cardíaca (DE WALL, 1992).

As células vermelhas do sangue, contagem de plaquetas e concentração de hemoglobina são reduzidas em ambas às infecções. Quadros agudos são caracterizados por neutropenia e linfopenia. A diminuição do fibrinogênio no plasma, o aumento do ferro e do fósforo no soro e a elevação da concentração de bilirrubina foram relatados (DE WALL; HEERDEN; POTGIETER, 1987). Variados graus de hemoglobinúria são observados durante infecção por *B. equi* (DE WALL, 1992).

A redução do volume globular (VG) está relacionada à fagocitose de hemácias normais e parasitadas devido à aderência de antígenos liberados pelos parasitos, a membrana das hemácias, favorecendo sua eliminação pelo sistema imune do hospedeiro (RIBEIRO et al., 1995). A Babesia pode ser eliminado pela destruição do parasita com a célula do hospedeiro. Isto é alcançado através da mudança da permeabilidade da membrana da Babesia pelo anticorpo. A fagocitose ocorre no baço, que se encontra hipertrofiado nos casos agudos (SHAH-FISHER; SAY, 1989).

É observada relação inversa entre o hematócrito e o título de anticorpos durante a fase aguda da infecção, cujas oscilações provavelmente estejam ligadas à dinâmica do parasito na circulação. O título de anticorpos está relacionado diretamente com a multiplicação do parasito, mesmo durante baixas parasitemias. O hematócrito cai rapidamente durante a fase aguda da infecção (CUNHA et al., 1998).

Achados gerais de patologia incluem anemia e icterícia; edema de tecido subcutâneo e subserosa; variados graus de edemaciação; hepato e esplenomegalia; rins aumentados e de coloração pálida para marrom avermelhado; ascite, hidrotorax e hidropericárdio com hemorragia

no epi e endocárdio; congestão e edema de pulmões e aumento de nódulos linfáticos (DE WALL, 1992).

Exames histopatológicos revelam congestão e edema dos pulmões; necrose centrolobular do fígado com estase biliar, bem como nefrose caracterizada por degeneração hidrópica e gordurosa do epitélio tubular. Há também grande proliferação celular do sistema retículo endotelial do fígado, rins, pulmões e nódulos linfáticos. Foi relatada a ocorrência de trombos nos vasos sangüíneos do fígado e pulmões (DE WALL, 1992; MAHONEY et al., 1977).

Várias complicações foram relacionadas a babesiose eqüina, incluindo falência renal aguda, cólica e enterite, perda parcial ou completa de fertilidade em garanhões e aborto em éguas, como resultado de doença sistêmica e pirexia. O aborto é relativamente comum e se seguir à infecção intra-uterina do feto. Fetos abortados mostram-se autolisados (DE WALL, 1992; DE WALL; HEERDEND, 1994).

A babesiose neonatal em potros é caracterizada por debilidade ao nascimento ou rápido começo de fraqueza e pelo desenvolvimento de anemia severa e icterícia, logo após a ingestão do colostro. Os potros afetados tornam-se progressivamente letárgicos e por último incapazes de manter a posição quadrupedal ou mamar. A febre e petéquias em mucosas estão presentes. Alguns potros aparentemente normais ao nascimento, desenvolvem os sintomas somente após dois a três dias (DE WALL, 1992; ERBSLOH, 1975).

Casos subagudos mostram vários graus de anorexia, perda de peso, temperatura normal ou elevada e alteração do padrão respiratório e pulso diminuído. A febre é algumas vezes intermitente na infecção por *B. equi*. As membranas mucosas variam de pálido cor-de-rosa ou pálido amarelo para amarelo vivo. Petéquias e equimoses podem ser visíveis nas mucosas.

Animais podem demonstrar sinais de cólica como andar desajeitado, olhar para o flanco e/ou para baixo. A constipação pode ocorrer e é freqüentemente seguida por diarreia. A urina torna-se amarelo escuro para laranja ou marrom, mas em alguns casos ela é marrom avermelhada em resultado da presença de hemoglobina e pigmentos biliares. O baço está freqüentemente aumentado (DE WALL, 1992).

Usualmente, casos crônicos apresentam-se com uma história de sinais clínicos não específicos incluindo moderada inapetência, performance diminuída e diminuição da massa corpórea (DE WALL, 1992). O hematócrito não sofre alterações significativas durante a fase crônica (CUNHA et al., 1998). Nas recrudescências das parasitemias a redução do hematócrito é menor do que na primo-infecção, demonstrando que os animais estão na fase crônica da doença (RIBEIRO et al., 1995).

O baço de animais infectados pela *Babesia* alberga eritrócitos parasitados e parasitas livres em número elevado. Em casos de estresse e/ou exercício físico, este órgão se contrai intensamente em eqüinos, liberando grande quantidade de eritrócitos, plaquetas e leucócitos para a circulação. A *Babesia equi* tem preferência pelo sangue capilar e ocorre na circulação periférica em casos de parasitemia intensa. No entanto, pela contração do baço em casos de estresse e exercícios, pode ser encontrada na circulação periférica mesmo em portadores assintomáticos (SMITH; ERICKSON; DEBOWES, 1989; STOBBE et al., 1992).

Os casos não tratados ou negligenciados apresentam anemia severa e sinais de debilidade geral. É observado moderado edema com aumento de tamanho da porção distal dos membros, infecção concurrente viral ou helmíntica o que pode explicar sinais clínicos atípicos. Foi relatado envolvimento do sistema nervoso central no caso de infecção por *B. caballi* (DE WALL, 1992).

O diagnóstico de babesiose equina pode ser realizado com base em evidências clínicas combinadas à exames laboratoriais, com identificação direta do organismo através de microscopia óptica utilizando esfregaço sangüíneo do carrapato, sendo difícil de observar a presença do parasito, ou do equino, pelo método de coloração por Giemsa ou microscopia fluorescente e método de coloração com laranja de acridina. Entretanto, o baixo número de parasitas em animais carreadores torna o exame microscópico difícil. O diagnóstico diferencial deve excluir leptospirose, anemia infecciosa equina e toxicoses (DE WALL; HEERDEN, 1994; PHIPPS, 1996).

Os métodos indiretos de diagnóstico laboratorial incluem a inoculação de grande quantidade de sangue infectado em um animal susceptível e preferencialmente um cavalo esplenectomizado. O sorodiagnóstico usando o Teste de Fixação do Complemento (CFT) é reconhecido internacionalmente como teste oficial para a importação de animais em países que exigem animais negativos para babesiose. Entretanto, neste teste pode ocorrer falso positivo, falso negativo e reações cruzadas, sendo que o Teste de Imunofluorescência Indireta de Anticorpos (IFA) é mais sensível e específico, podendo diferenciar estas reações. O Teste Elisa (Current Enzyme Linked Immunosorbent Assay) também pode ser realizado, mas não é suficiente para o diagnóstico diferencial. Recentemente foi desenvolvido o Teste de Reação em cadeia polimerase (PCR) que é altamente sensível, mas no presente sua realização é restrita em laboratórios de pesquisa, pois está ainda em desenvolvimento (ALMEIDA, 2001). Sondas de DNA (DNA probes) podem ser usadas para a detecção do parasito no sangue, tecidos e organismo do carrapato (BOSE et al., 1995; PHIPPS, 1996; STOBBE et al., 1991).

Para *B. equi*, o teste IFA é mais sensível que o teste CF. Para *B. caballi* o teste de CF é insensível. O teste Elisa é sensível, mas revela reações cruzadas com *B. equi*. O teste “Western

blot” é o único teste que não mostra reações cruzadas, no entanto, tem menor sensibilidade que o teste Elisa. O teste IFA também pode ser usado em adição ao “Western blot” que é o teste mais sensível para detectar anticorpos contra *B. caballi*, seguido da infecção inicial e mais específico que outros testes (BARBOSA et al., 1995; HEUCHERT et al., 1999).

O tratamento da babesiose equina é baseado na combinação de um tratamento suporte e sintomático, bem como com quimioterapia. O tratamento suporte é essencial em quadros agudos e pode incluir transfusão de sangue, fluidoterapia, vitaminas e boa nutrição. A quimioterapia em cavalos é difícil e necessita de cuidados em relação à toxicidade das drogas e administração de dosagem correta (PHIPPS, 1996).

## 1.2 SOBRE OS MEDICAMENTOS EMPREGADOS NO TRATAMENTO DAS BABESIOSES

Vários medicamentos são utilizados no tratamento da babesiose em diferentes espécies animais, alguns dos quais agindo de maneira seletiva contra uma ou outra espécie que ocorre no mesmo hospedeiro. Assim, podem ser citados o Azul-de-Tripan, os derivados do Quinurônio, das Diamidinas e das Carbanilidas. Dentre eles destacam-se os derivados das Carbanilidas. Combinações das carbanilidas com as diamidinas resultaram no desenvolvimento de vários babesicidas: diminazene, imidocarb, amicarbilida, fenamidina, os quais são capazes de agir sobre todas as espécies de Babesia (FERREIRA; DELL'PORTO, 1999).

Dentre esses derivados o mais conhecido é o dipropionato de imidocarb [3,3-bis-(2-imidazolin-2yl) carbanilida]<sup>1</sup>. O dipropionato de imidocarb é um pó esbranquiçado, altamente solúvel em água e apresenta ponto de fusão a 200°C (BRANDER et al., 1991).

Seguido de injeção parenteral, o imidocarb promove níveis transitórios no sangue. Este composto apresenta tendência a se depositar nos rins e é reabsorvido de forma inalterada, sendo biotransformado no fígado. Acumula-se em pequena quantidade no sistema nervoso central permanecendo neste local por meses (BOOTH; MCDONALD, 1983). Os eqüinos tratados com imidocarb apresentam pico plasmático do medicamento no terceiro e sexto dia após a administração. Nos tecidos, o pico ocorre no terceiro dia nos rins e no sexto dia no fígado (FRERICHS; ALLEN; HOLBROOK, 1973). Em eqüinos tratados com 2,4mg/kg do imidocarb ocorrem três picos plasmáticos do medicamento que correspondem ao 4º, 16º e 22º dia após a administração (ALMEIDA, 2001).

O imidocarb age no núcleo do parasita promovendo alterações no seu número e tamanho, bem como na morfologia (vacuolização) do citoplasma. A atividade antiparasitária das diamidinas ocorre pela interferência com a glicólise aeróbica e com a síntese de ácido desoxirribonucléico (DNA) do parasita (ANDRADE, 2002; BOOTH; MCDONALD, 1983). Em pôneis infectados por *B. equi* tratados com imidocarb, este medicamento apresenta efeito direto no parasito, causando dilatação da cisterna nuclear, cariorrexis, vacuolização do citoplasma, inibição da formação de vacúolos alimentares e diminuição ribossomal (SIMPSON; NEAL, 1980). Também nesses animais, a droga promove a formação de cristais de vários tamanhos e formas nos eritrócitos, que distorcem sua morfologia, os quais ficam aderidos ou então limitam a membrana do parasito. Há indicações de que pode ocorrer a formação de cristais em eritrócitos

---

<sup>1</sup> Imizol<sup>®</sup>

de cavalos infectados por *B. equi* e tratados com o imidocarb (SIMPSON; TAYLOR; KITCHEN, 1980).

O interesse no imidocarb não tem somente se centrado no seu emprego no tratamento da babesiose clínica, mas, também, no seu uso como profilático. O efeito profilático para ser aceitável depende da longa atividade residual, devendo esta ser administrada para o animal antes da exposição à *Babesia* (BOOTH; MCDONALD, 1983). A ação prolongada ajuda no controle de infecções clínicas sem bloquear as defesas imunes. A infecção pode ser natural ou artificial através da inoculação de sangue contaminado. O animal a ser premunido é introduzido em um pasto contaminado após a administração do imidocarb. Durante semanas, quando a concentração da droga é mantida no animal, a infecção inicial e reinfeção não alcançam nível clínico, mas produzem a premunicação desejada (SHAH-FISHER; SAY, 1989). O imidocarb apresenta, em bovinos, melhor atividade profilática se comparado a outros fármacos como o diminazene e oxitetraciclina (KUTTER; JOHNSON, 1986).

O imidocarb é recomendado em aplicação única de 1,2 mg/kg subcutâneo ou intramuscular para bovinos, dose esta capaz de inibir a parasitemia por *B. bigemina* e *B. bovis*; doses de até 5,0 mg/kg podem ter efeito esterilizante. Este derivado carbanilida tem o inconveniente de deixar resíduos de até cento e setenta dias nos rins e fígado, requerendo um período de no mínimo trinta dias de carência em animais destinados ao consumo. Para eqüinos com infecção por *B. caballi* recomenda-se a dosagem de 2,0 mg/kg/dia intramuscular, em dois dias consecutivos. Em casos de infecção por *B. equi* a dosagem é de três aplicações de 4mg/kg intramuscular, com intervalo de 24 horas entre as doses. Em cães, a dosagem é de 2-3mg/kg intramuscular ou intravenosa em dose única (FERREIRA; DELL'PORTO, 1999).



O imidocarb é considerado menos tóxico do que outras drogas antibabesias, mas não há medicamento totalmente seguro (BOOTH; MCDONALD, 1983). Para cavalos, a DL 50% (dose letal em 50% dos animais tratados) do dipropionato de imidocarb é de duas doses de  $15,99 \pm 1,49$  mg/kg com mortalidade ocorrendo a partir do 6º dia após a primeira injeção. Altos níveis de dipropionato de imidocarb estão relacionados com o aumento da taxa de morbidade, mortalidade, reação local e sistêmica, altos níveis de uréia nitrogenada no sangue, aspartato aminotransferase no soro, sorbitol desidrogenase no soro, creatinina fosfoquinase no soro, neutrofilia e lesões severas em rins, fígado e pulmões. As morbidades são atribuídas à necrose renal tubular cortical aguda e necrose hepática periportal aguda, induzidas por duas injeções de 16 ou 32 mg/kg de dipropionato de imidocarb. Cavalos tratados com a dose de 2 mg/kg do imidocarb não demonstram sinais clínicos de reação adversa e, todos tratados com 4 mg/kg ou mais, apresentam sinais compatíveis com estimulação excessiva das porções cranial e caudal da divisão parassimpática do sistema nervoso autônomo (ADAMS, 1981). Doses maiores que as recomendadas causam irritação no local de aplicação, quando se utiliza a via subcutânea. Reações sistêmicas salivação profusa, moderada dispnéia, cólica e excesso de motilidade intestinal que resulta em diarreia (FRERICHS; ALLEN; HOLBROOK, 1973; FRERICKS; HOLBROOK, 1974). Para burros a DL50% do imidocarb é menor que 2 mg/kg (FRERICHS; ALLEN; HOLBROOK, 1973).

O dipropionato de imidocarb tem como vantagem principal sobre os outros medicamentos para babesiose, ser eficiente para diferentes espécies de *Babesias*, pois é indicado para infecções mistas ou para os casos em que a identificação dos agentes causadores não seja bem definida (FERREIRA; DELL'PORTO, 1999).

O imidocarb mostra-se promissor na eliminação do parasito, pois permite que animais tratados sejam transportados com segurança de áreas enzoóticas para áreas não enzoóticas. É efetivo no tratamento de animais doentes e portadores, e seu efeito cumulativo, permite que seja usado profilaticamente com vários graus de sucesso (BOOTH; MCDONALD, 1983; FRERICHS; ALLEN; HOLBROOK, 1973).

Recentemente, trabalho de nosso grupo de pesquisa estudou os efeitos da exposição no período de organogênese de éguas prenhes ao dipropionato de imidocarb, verificando que na dose 2,4 mg/Kg este medicamento é capaz de reduzir o tamanho das vesículas embrionárias das mesmas (ALMEIDA, 2001). Estes achados motivaram a realização deste trabalho no qual se investigou os efeitos da administração pré-natal do Imidocarb a ratas.

Neste sentido, este procedimento tem vantagens em função de um custo mais acessível, se comparado à realização de experimentação utilizando-se éguas como animais experimentais e também por um controle maior das condições experimentais, aliado à facilidade de interpretação dos resultados obtidos. Procurou-se, assim, contribuir com o conhecimento sobre os possíveis efeitos da administração de doses terapêuticas do dipropionato de imidocarb no período de organogênese. Foi empregada a dose de 1,7 mg/kg, que é terapêutica e a dose de 2,5 mg/kg, que também é uma dose terapêutica e que no trabalho de Almeida (2001), provocou diminuição no tamanho das vesículas embrionárias das éguas.

## **2 OBJETIVOS**

No presente trabalho foram apresentados um objetivo geral e objetivos específicos que serão abaixo descritos.

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar os efeitos embriotóxicos provocados pela administração do dipropionato de imidocarb no período de organogênese a ratas.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Avaliar os efeitos da administração do imidocarb no desempenho reprodutivo das fêmeas.

Avaliar os efeitos da administração do imidocarb sobre a ossificação da prole das fêmeas.

Avaliar os efeitos da administração do imidocarb no desenvolvimento visceral da prole das fêmeas.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Abaixo foram descritos os materiais e métodos utilizados neste trabalho, incluindo raça e espécie de animal empregado, medicamento usado com a via de exposição e período de administração, bem como todos os procedimentos realizados.

#### 3.1 ANIMAIS

Foram utilizadas ratas Wistar fêmeas, virgens, sexualmente maduras, pesando aproximadamente 250 g e machos da mesma espécie, pesando em torno de 250g, provenientes do Biotério do Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas do Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Paulista. Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno (43x23x16 cm) mantidas em uma sala com temperatura controlada por meio de aparelhos de ar condicionado ( $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) e ciclo de 12 horas, com luz ligada às 07:00 horas. Água e comida foram fornecidas "ad libitum" aos animais durante todo procedimento experimental.

#### 3.2 DROGAS

Foi utilizado o Dipropionato de imidocarb ou 3,3-bis-(2-imidazolin-2-il), Imizol<sup>®</sup>-Mallinckrodt Veterinary, suspenso em água destilada. A via utilizada foi a subcutânea. Foi empregada como solução controle NaCl 0,9%, administrada da mesma forma que o Dipropionato de Imidocarb.

### 3.3 PROCEDIMENTOS

Abaixo foram apresentados os procedimentos realizados para: avaliação do ciclo estral, acasalamento e diagnóstico de prenhez, laparotomia e avaliação do desempenho reprodutivo materno aos 21 dias de gestação e por último, análise dos fetos aos 21 dias de gestação.

#### 3.3.1 Avaliação do Ciclo Estral

No período da manhã foram realizados lavados vaginais nas ratas para determinação da fase do ciclo estral em que estas se encontravam. O diestro foi considerado quando se encontrou grande quantidade de leucócitos no lavado, com ou sem presença de muco; o proestro quando se encontrou predominância de células epiteliais nucleadas; o estro quando se encontrou, somente ou na sua maioria, células queratinizadas e a fase de metaestro quando o achado foi de células queratinizadas e de leucócitos no lavado. As fêmeas que se encontravam na fase de estro (presença de muitas células queratinizadas) foram então separadas para serem colocadas para acasalar no período noturno.

### 3.3.2 Acasalamento e Diagnóstico de Prenhez

Para o acasalamento as fêmeas foram distribuídas uma a uma em gaiolas de polietileno, onde, no final da tarde, foi colocado um macho sabidamente fértil. Na manhã subsequente, os machos foram retirados e os esfregaços vaginais coletados.

O fator indicativo de prenhez foi: presença de espermatozóide no lavado vaginal da fêmea. Este foi considerado como o primeiro dia de gestação. Durante a gestação foi mantida uma fêmea por gaiola, sendo que estas foram pesadas para controle de ganho de peso. Foi também feito controle da ingestão de água das fêmeas durante o período de administração da droga.

### 3.3.3 Laparotomia e Avaliação do Desempenho Reprodutivo Materno aos 21 Dias de Gestação

No 21º dia de gestação foi realizada, logo cedo pela manhã, a laparotomia das fêmeas após a eutanásia dos animais por inalação de éter sulfúrico. As fêmeas foram examinadas para verificação de alguma lesão ou patologia em órgãos. Expostos os cornos uterinos, foi feita a contagem dos sítios de implantação, pontos de reabsorção e pesagem do útero gravídico. Os ovários foram retirados, e os corpos lúteos contados, com o auxílio de uma lupa, para avaliação da quantidade de óvulos eliminados.

A seguir, o número de fetos foi contado e cada feto foi pesado individualmente assim como suas respectivas placentas.

A porcentagem de perda embrionária pré-implantação foi determinada através da seguinte proporção:

$$\% \text{ de perda pré-implantação} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de corpos lúteos} - \text{n}^\circ \text{ de implantações}}{\text{n}^\circ \text{ de corpos lúteos}} \times 100$$

Para a determinação da perda embrionária após implantação foi utilizada a proporção:

$$\% \text{ de perda pós-implantação} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de implantações} - \text{n}^\circ \text{ de fetos vivos}}{\text{n}^\circ \text{ de implantações}} \times 100$$

### 3.3.4 Análise dos Fetos aos 21 Dias de Gestação

Após a retirada do útero cada filhote foi pesado individualmente bem como sua placenta, em seguida foram examinados macroscopicamente quanto às possíveis anomalias ou malformações externas tais como: conformação craniana, implantação das orelhas, palato, conformação da cauda e das patas, perfuração anal, entre outros.

A metade de cada ninhada foi examinada quanto à presença de alterações esqueléticas segundo método de coloração proposto por Staples e Schenel (1964). Neste método os fetos são colocados em acetona P. A. durante a noite, em seguida é feita a evisceração e os fetos são mantidos em solução KOH 0,8% e alizarina por três a quatro dias, são então conservados em solução clareadora até a análise.

Os pontos de ossificação, que determinam o grau de desenvolvimento fetal, foram calculados segundo método de escores proposto por Aliverti et al. (1979). Neste método são tomados como centros de ossificação, falange anterior, metacarpo, esternóbrio, metatarso e vértebras caudais. É então calculada a ossificação total que vai determinar menor ou maior grau de desenvolvimento.

A outra metade foi preparada para estudo visceral segundo método de Wilson (1965). Este método propõe que os fetos devem ser colocados em Bouin por três a quatro dias, em seguida são deixados em álcool 80% por dois dias e então são conservados em álcool 90% até a leitura. Para a leitura cada feto foi pego individualmente e neste foram realizados secções seriadas de maneira a se observar as vísceras e estruturas desejadas.



#### 4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise dos dados foram utilizados os seguintes testes:

A ANOVA de uma via foi empregada para avaliar todos os parâmetros do desempenho reprodutivo das ratas, bem como seu peso e ganho de peso durante a gestação. O teste de Tukey-Kramer foi empregado como teste post hoc. As anomalias e malformações fetais foram analisadas pelo teste do Qui quadrado.

O Teste t de Student foi utilizado para avaliar o consumo de água das fêmeas. Em todos os casos a probabilidade de 5% foi considerada capaz de revelar diferenças significativas entre os grupos.

## 5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram utilizadas ratas fêmeas que após determinação do ciclo estral foram colocadas para acasalamento e foi determinante de gestação pela presença de espermatozóides no lavado vaginal.

Ratas prenhes foram divididas em três grupos: um controle e dois experimentais, com 20 animais cada. Os animais de um grupo experimental receberam do sexto dia de prenhez ao décimo quinto dia, 1,7 mg/kg do imidocarb por via subcutânea e as do outro, 2,5mg/kg por via subcutânea, pelo mesmo período. Os animais do grupo controle, foram tratados da mesma forma, porém com NaCl a 0,9%. Durante a gestação todas as fêmeas foram pesadas diariamente. Mediu-se o consumo de água durante o período de administração da droga nos animais do grupo experimental que recebeu 2,5 mg/kg do dipropionato de imidocarb.

Aos 21<sup>o</sup> dias da gestação as fêmeas foram submetidas à laparotomia após eutanásia por inalação de éter sulfúrico, o útero gravídico foi pesado bem como cada filhote individualmente e sua respectiva placenta. Foram contados o número de filhotes, número de corpos lúteos nos ovários e de implantações no útero. Cada filhote foi avaliado quanto a estar vivo ou morto e quanto a malformações e anomalias externas. Em seguida procedeu-se à avaliação do desempenho reprodutivo das fêmeas e preparo dos fetos para o estudo ósseo e visceral.

## 6 RESULTADOS

Experimento 1: Efeitos da administração de 1,7 ou 2,5 mg/kg dipropionato de imidocarb durante o período organogênico no peso corporal e ganho de peso materno.

A tabela 1 mostra os pesos corporais de ratas expostas durante o período organogênico às duas doses do dipropionato de imidocarb avaliados no 1º, do 6º ao 15º e no 21º dia de gestação. A ANOVA de uma via não indicou a existência de diferenças significantes entre os valores dos animais dos grupos controle e experimental em todos os dias de observação (dia 1 –  $F = 0,5557$ ;  $df = 2/57$ ;  $p = 0,5767$ ; dia 6 –  $F = 0,9674$ ;  $df = 2/57$ ;  $p = 0,3862$ ; dia 7 –  $F = 0,7265$ ;  $df = 2/57$ ;  $p = 0,4880$ ; dia 8 –  $F = 0,7619$ ;  $df = 2/57$ ;  $p = 0,4715$ ; dia 9 –  $F = 0,6557$ ;  $df = 2/57$ ;  $p = 0,5229$ ; dia 10 –  $F = 0,4525$ ;  $df = 2/57$ ;  $p = 0,6383$ ; dia 11 –  $F = 0,7221$ ;  $df = 2/57$ ;  $p = 0,4901$ ; dia 12 –  $F = 0,7288$ ;  $df = 2/57$ ;  $p = 0,4869$ ; dia 13 –  $F = 1,112$ ;  $df = 2/57$ ;  $p = 0,3359$ ; dia 14 –  $F = 0,5059$ ;  $df = 2/57$ ;  $p = 0,6056$ ; dia 15 –  $F = 0,6173$ ;  $df = 2/57$ ;  $p = 0,5429$ ; dia 21 –  $F = 2,476$ ;  $df = 2/57$ ;  $p = 0,0931$ ).

A tabela 2 mostra os ganhos de peso corporal de ratas prenhes, que receberam 1,7 mg/kg ou 2,5 mg/kg do dipropionato de imidocarb, do 6º ao 15º dia de gestação. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação ao ganho de peso entre os dias 1-6 ( $F = 1,295$ ;  $df = 2/57$ ;  $p = 0,2818$ ), 6-15 ( $F = 1,336$ ;  $df = 2/57$ ;  $p = 0,2711$ ) e 15-21 ( $F = 2,555$ ;  $df = 2/57$ ;  $p = 0,0865$ ). Além disso, o peso real ( $F = 0,8747$ ;  $df = 2/57$ ;  $p = 0,4225$ ) bem como o ganho de peso real ( $F = 0,9170$ ;  $df = 2/57$ ;  $p = 0,4055$ ) não foram diferentes entre os grupos. Pode-se notar que houve diferenças estatisticamente significantes em relação ao peso do útero gravídico do grupo experimental que recebeu a dose de 2,5 mg/kg, se comparado aos animais do grupo

controle e do grupo experimental que recebeu a dose de 1,7 mg/kg ( $F = 6,054$ ;  $df = 2/57$ ;  $p = 0,0041$ ).

A tabela 3 mostra o consumo de água de ratas prenhes, tratadas ou não no período organogênico, com a dose de 2,5mg/kg do dipropionato de imidocarb. Nota-se que não houve diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) entre os valores do grupo experimental que recebeu a dose de 2,5 mg/kg e o grupo controle.

Tabela 1 - Efeitos da administração de 1,7 mg/kg e de 2,5 mg/kg do dipropionato de imidocarb a ratas prenhes durante o período organogênico no peso corporal materno. São apresentadas as médias e respectivos erros-padrão, ( ) = número de ninhadas

Dias de gestação	Grupos		
	Controle (20)	1,7 mg/kg (20)	2,5 mg/kg (20)
1	270,05 ± 7,20	261,55 ± 6,70	270,90 ± 6,88
6	294,85 ± 7,64	282,45 ± 7,77	296,15 ± 7,64
7	296,50 ± 7,91	286,00 ± 7,76	298,60 ± 8,07
8	300,75 ± 8,11	289,20 ± 7,97	302,20 ± 8,39
9	302,50 ± 7,99	293,10 ± 8,13	305,95 ± 8,50
10	306,35 ± 8,24	298,75 ± 7,74	309,35 ± 8,36
11	309,55 ± 8,14	300,65 ± 8,58	314,70 ± 8,36
12	313,20 ± 8,32	305,05 ± 8,811	319,50 ± 8,30
13	317,85 ± 8,28	309,45 ± 8,92	327,80 ± 8,91
14	322,35±8,64	313,60±8,97	325,45 ± 8,28
15	324,20 ± 8,80	315,80 ± 8,92	329,35 ± 8,38
21	391,05 ± 14,03	373,05 ± 9,46	409,70 ± 10,97

ANOVA.  $p > 0,05$  entre os diferentes grupos.

Tabela 2 - Efeitos da administração de 1,7 mg/kg e de 2,5 mg/kg do dipropionato de imidocarb à ratas prenhes durante o período organogênico no ganho de peso corporal materno. São apresentadas as médias e respectivos erros-padrão, ( ) = número de ninhadas

Dias de gestação	Grupos		
	Controle (20)	1,7 mg/kg (20)	2,5 mg/kg (20)
1 – 6	24,80 ± 2,34	20,90 ± 2,90	26,10 ± 1,74
6 – 15	29,85 ± 2,31	35,65 ± 3,25	33,90 ± 1,98
15 –21	66,85 ± 8,23	57,25 ± 3,37	77,35 ± 6,28
Peso do útero gravídico	65,40 ± 7,29	63,01 ± 3,63	84,99 ± 2,37*
Peso real	326,89 ± 10,33	310,06 ± 9,33	324,71 ± 9,65
Ganho de peso real	62,03 ± 7,64	51,13 ± 5,30	53,80 ± 4,35

ANOVA seguida do Teste de Tukey-Kramer; \* p < 0,01 em relação ao grupo que recebeu a dose de 1,7 mg/kg e p < 0,05 em relação ao grupo controle.

Obs: 1) Peso real = peso ao final da gestação – peso do útero gravídico.

2) Ganho de peso real = ganho de peso ao final da gestação – útero gravídico.

Tabela 3 - Efeitos da administração de 2,5 mg/kg do dipropionato de imidocarb a ratas prenhes durante o período organogênico no consumo de água (ml) materno. São apresentadas as médias e respectivos erros-padrão, ( ) = número de ninhadas

Consumo de água	Grupos	
	Controle	2,5 mg/kg
Dia /grupo	(20)	(20)
6	48,75±3,38	47,00±3,21
7	49,25±2,79	47,75±2,22
8	48,25 ± 2,76	45,25 ± 3,10
9	53,25 ± 3,86	51,25 ± 4,13
10	54,00 ± 4,82	54,50 ± 3,47
11	51,25 ± 1,77	55,00 ± 2,48
12	54,25 ± 2,21	57,75 ± 4,12
13	53,00 ± 2,88	54,00 ± 3,33
14	54,25 ± 2,24	48,75 ± 1,94
15	54,75 ± 2,75	54,25 ± 3,77

Teste t de Student.

Experimento 2: Efeitos da administração de 1,7 ou 2,5 mg/kg do dipropionato de imidocarb durante o período organogênico no desempenho reprodutivo de ratas.

A tabela 4 mostra o desempenho reprodutivo de ratas tratadas no período de organogênese com as doses de 1,7 mg/kg e 2,5 mg/kg, bem como do respectivo grupo controle.

Notou-se que:

A dose de 1,7 mg/kg do dipropionato de imidocarb reduziu significativamente o peso fetal individual em relação aos animais do grupo controle e tratados com 2,5 mg/kg do medicamento ( $F = 83,527$ ;  $df = 2/691$ ;  $p < 0,001$ );

A dose de 2,5mg/kg do dipropionato de imidocarb aumentou significativamente o número de filhotes por ninhada em relação aos animais do grupo controle ( $F = 3,751$ ;  $df = 2/57$ ;  $p = 0,0295$ );

A dose de 2,5 mg/kg do dipropionato de imidocarb aumentou o peso do útero gravídico em relação aos animais do grupo controle e tratados com 1,7 mg/kg do dipropionato de imidocarb ( $F = 6,054$ ;  $df = 2/57$ ;  $p = 0,0041$ );

A dose de 2,5 mg/kg aumentou o peso fetal por ninhada em relação aos animais do grupo tratado com 1,7 mg/kg ( $F = 4,016$ ;  $df = 2/57$ ;  $p = 0,0233$ );

A dose de 2,5 mg/kg reduziu o peso individual da placenta ( $F = 55,76$ ;  $df = 2/691$ ;  $p < 0,0001$ ) e o peso da placenta por ninhada ( $F = 7,263$ ;  $df = 2/57$ ;  $p = 0,0015$ ) em relação aos animais do grupo controle e tratados com 1,7 mg/kg do dipropionato de imidocarb.



Não se notou alteração nos seguintes parâmetros do desempenho reprodutivo: número médio de fêmeas por ninhada ( $F = 2,418$ ;  $df = 2/57$ ;  $p = 0,0981$ ), número médio de machos por ninhada ( $F = 2,066$ ;  $df = 2/57$ ;  $p = 0,1361$ ), número de corpos lúteos ( $F = 0,1169$ ;  $df = 2/57$ ;  $p = 0,8899$ ), número de implantações ( $F = 3,030$ ;  $df = 2/57$ ;  $p = 0,0562$ ), porcentagem de perda pós implantação ( $F = 1,280$ ;  $df = 2/57$ ;  $p = 0,2858$ ).

A porcentagem de perda pré-implantação ( $F = 3,017$ ;  $df = 2/57$ ;  $p < 0,0001$ ) foi significativamente menor nos animais tratados com 2,5 mg/kg do dipropionato de imidocarb em relação aos animais do grupo controle e tratados com 1,7 mg/kg do medicamento.

Tabela 4 - Efeitos da administração do dipropionato de imidocarb durante o período organogênico no desempenho reprodutivo de ratas. São apresentadas as respectivas médias e erros-padrão, ( ) = número de ninhadas

Parâmetros	Grupos		
	Controle (20)	1,7 mg/kg (20)	2,5 mg/kg (20)
Nº de fêmeas acasaladas	20	20	20
Com reabsorção total	0	0	0
Nº de corpos lúteos	14,00 ± 0,72	14,20 ± 0,60	14,40 ± 0,36
Nº de implantações	11,10 ± 1,25	12,05 ± 0,78	14,10 ± 0,38
Nº de fetos vivos	199	232	263
Nº de fetos mortos	0	0	0
Nº de machos/fêmeas	98/101	117/115	130/133
Porcentagem filhotes machos/fêmeas	49,2/50,8	50,4/49,6	49,4/50,6
Nº médio de machos/ninhada	4,90 ± 0,74	5,85 ± 0,42	6,50 ± 0,45
Nº médio de fêmeas/ninhada	5,05 ± 0,59	5,75 ± 0,53	6,65 ± 0,40
Nº de fetos/ninhada	9,95 ± 1,14	11,60 ± 0,78	13,15 ± 0,33 <sup>*b</sup>
% de perda pré-implantação	28,22	24,33	1,58 <sup>**</sup>
% de perda pós-implantação	8,32	3,92	6,23
Peso do útero gravídico	65,40 ± 7,29	63,01 ± 3,63	84,99 ± 2,37 <sup>*c</sup>
Peso fetal individual	4,01 ± 0,06	3,24 ± 0,05 <sup>*d</sup>	4,11 ± 0,03
Peso fetal/ninhada	3,92 ± 0,23	3,37 ± 0,20	4,11 ± 0,11 <sup>*</sup>
Peso individual da placenta	1,05 ± 0,02	1,08 ± 0,02	0,81 ± 0,01 <sup>**</sup>
Peso da placenta/ninhada	1,15 ± 0,08	1,11 ± 0,08	0,80 ± 0,02 <sup>*a</sup>

ANOVA seguida por Teste de Tukey-Kramer. \* p < 0,05 em relação ao grupo que recebeu 1,7 mg/kg; \*\* p < 0,0001 em relação ao grupo que recebeu a dose de 1,7 mg/kg e em relação ao grupo controle; <sup>\*a</sup> p < 0,01 em relação ao grupo que recebeu a dose de 1,7 mg/kg e em relação ao controle; <sup>\*b</sup> p < 0,05 em relação ao grupo controle; <sup>\*c</sup> p < 0,01 em relação ao grupo controle e em relação ao grupo que recebeu a dose de 1,7 mg/kg; <sup>\*d</sup> p < 0,0001 em relação ao grupo controle e em relação ao grupo que recebeu 2,5 mg/kg.

Experimento 3: Avaliação óssea e visceral da prole de ratas tratadas com o dipropionato de imidocarb.

A tabela 5 mostra os resultados da avaliação de malformações e anomalias externas e de malformações e anomalias esqueléticas da prole de ratas tratadas no período organogênico com as doses de 1,7 mg/kg e 2,5mg/kg do dipropionato de imidocarb. Nota-se que a exposição às duas doses do parasiticida não foi capaz de aumentar a incidência de malformações e anomalias esqueléticas da prole destas ratas.

A tabela 6 mostra os resultados da avaliação de anomalias e malformações viscerais da prole de ratas tratadas no período organogênico com as doses de 1,7 mg/kg e 2,5mg/kg do dipropionato de imidocarb. Nota-se que a exposição às duas doses do parasiticida também não foi capaz de aumentar a incidência de malformações e anomalias viscerais da prole destas ratas.

A tabela 7 mostra a avaliação do número dos centros de ossificação da prole de ratas tratadas com a dose de 1,7 mg/kg e com a dose de 2,5 mg/kg do dipropionato de imidocarb. Nota-se que na dose de 2,5 mg/kg aumentou a ossificação do esternébrio estatisticamente de forma significativa ( $F = 3,947$ ;  $df = 2/691$ ;  $p = 0,0198$ ) cujo número foi maior em relação aos dos animais do grupo controle. Nota-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os três grupos de animais no número dos seguintes centros de ossificação: falange anterior ( $F = 0,6951$ ;  $df = 2/691$ ;  $p = 0,4994$ ), metacarpo ( $F = 0,06365$ ;  $df = 2/691$ ;  $p = 0,9383$ ), metatarso ( $F = 0,5159$ ;  $df = 2/691$ ;  $p = 0,5972$ ), vértebras caudais ( $F = 2,138$ ;  $df = 2/691$ ;  $p = 0,1187$ ). A ossificação total ( $F = 3,036$ ;  $df = 2/691$ ;  $p = 0,0487$ ) foi aumentada nos animais tratados com a dose de 2,5 mg/kg do dipropionato de imidocarb.

Tabela 5 - Incidência de malformações e anomalias externas e de malformações e anomalias esqueléticas na prole de ratas tratadas no período organogênico com a dose de 1,7 mg/kg e com a dose de 2,5 mg /kg do dipropionato de imidocarb no período organogênico. São apresentadas as frequências de ocorrência, ( ) = número de ninhadas.

	Grupos		
	Controle	1,7 mg/kg	2,5 mg/kg
	(20)	(20)	(20)
Malformações	0	0	0
Externas			
Fetos	0/199	0/232	0/263
Afetados			
Ninhadas	0/20	0/20	0/20
afetadas			
Anomalias			
Externas			
Fetos	0/199	0/232	0/263
Afetados			
Ninhadas	0/20	0/20	0/20
afetadas			
Malformações			
Esqueléticas			
Fetos	0/199	0/232	0/263
Afetados			
Ninhadas	0/20	0/20	0/20
afetadas			
Anomalias			
Esqueléticas			
Fetos	6/199	6/232	7/263
afetados			
Ninhadas	3/20	3/20	4/20
afetadas			
Anomalia de	5/199	4/232	5/263
esternóbrio			
14 <sup>a</sup> Costela	1/199	2/232	2/263
rudimentar			

Teste do Qui-quadrado.

Tabela 6 - Incidência de malformações e anomalias viscerais na prole de ratas tratadas no período organogênico com 1,7 mg/kg e 2,5 mg/kg do dipropionato de imidocarb. São apresentadas as frequências de ocorrência, ( ) = número de ninhadas

	Grupos		
	Controle	1,7 mg/kg	2,5 mg/kg
	(20)	(20)	(20)
Malformações			
Viscerais			
Fetos afetados	0/199	1/232	0/263
Ninhadas afetadas	0/20	1/20	0/20
Hidrocefalia	0/199	1/232	0/263
Anomalias			
Viscerais			
Fetos afetados	1/199	0/232	1/263
Ninhadas afetadas	1/20	0/20	1/20
Hemorragia Renal	0/199	0/232	1/263
Hemorragia cerebral	1/199	0/232	0/263

Teste do Qui quadrado.

Tabela 7 - Número de centros de ossificação da prole de ratas expostas a dose de 1,7 mg/kg e a dose de 2,5 mg/kg do dipropionato de imidocarb, por via subcutânea, do 6° ao 15° dia de gestação. São apresentadas as médias e respectivos erros-padrão, ( ) = número de ninhadas

Centros de ossificação	Grupos		
	Controle (20)	1,7 mg/kg (20)	2,5 mg/kg (20)
Falange anterior	3,96 ± 0,01	3,97 ± 0,01	3,95 ± 0,01
Metacarpo	7,94 ± 0,01	7,94 ± 0,01	7,95 ± 0,01
Esternébrio	5,88 ± 0,02	5,94 ± 0,01	5,95 ± 0,01 <sup>a</sup>
Metatarso	7,93 ± 0,01	7,95 ± 0,01	7,95 ± 0,01
Vértebras Caudais	3,82 ± 0,03	3,89 ± 0,02	3,90 ± 0,02
Ossificação total	29,61 ± 0,06	29,65 ± 0,05	29,78 ± 0,03*

ANOVA seguida pelo Teste de Turkey-Krumer; \*  $p < 0,05$  em relação ao controle.

## 7 DISCUSSÃO

A administração de 1,7 mg/kg e de 2,5 mg/kg do dipropionato de imidocarb a ratas gestantes não produziu toxicidade materna e não ocorreram efeitos teratogênicos sobre a prole. Porém, observou-se um maior número de filhotes por ninhada, aumento de peso dos filhotes por ninhada, diminuição do peso da placenta individual e por ninhada e também uma maior ossificação total da prole de ratas tratadas com 2,5 mg/kg do dipropionato de imidocarb no período de organogênese.

A toxicologia do desenvolvimento preocupa-se com qualquer efeito prejudicial aos organismos em desenvolvimento produzido pela exposição materna a diferentes agentes. Para que um agente seja classificado como um toxicante do desenvolvimento ele precisa produzir seus efeitos adversos no conceito em níveis de exposição que não induzam sinais severos de toxicidade materna. A toxicidade materna é um fator significativo que pode influenciar nos mecanismos de teratogênese (KHERA, 1985). A toxicidade materna pode ser avaliada através de alguns parâmetros como peso corporal, consumo de alimento e ingestão de água, peso renal e hepático e sinais clínicos propriamente de uma intoxicação (CARNEY, 1997; KHERA, 1984). Neste sentido, é preciso que se determine a dose tóxica materna para depois se trabalhar com níveis de doses adequadas ao estudo dos efeitos tóxicos no desenvolvimento de um determinado toxicante. Nosso objetivo com esse trabalho não foi realizar um teste de toxicidade clássico para avaliação dos efeitos embriotóxicos do dipropionato de imidocarb, mas sim realizar uma comparação dos possíveis efeitos de duas doses terapêuticas diferentes administradas a ratas gestantes sobre a sua prole. Foram empregadas duas doses, a de 1,7 mg/kg, que é uma das doses terapêuticas empregadas do dipropionato de imidocarb e a dose de 2,5 mg/kg, que de acordo com

experimentos já realizados, provocou alterações no desenvolvimento da vesícula embrionária em cavalos e que também é a dose terapêutica comumente mais utilizada. Foram utilizadas ratas como modelos experimentais em função de um custo mais acessível e pelo fato de que a metodologia é amplamente conhecida e padronizada. Além disso, o rato apresenta todo um histórico de dados de controle e também é uma das espécies mais sensíveis a ação de teratogênicos (SCHARDEIN; SCHWETZ; KENEL, 1985).

O processo de embriogênese é uma seqüência precisa de proliferação, diferenciação, migração celular e finalmente de organogênese. Durante o começo da proliferação celular, no início da gestação, não são normalmente produzidas malformações. Neste momento o embrião pode morrer ou sobreviver e neste último caso desenvolver-se normalmente. Também é difícil se produzir anormalidades em uma fase de desenvolvimento tardio no qual o processo de organogênese já tenha se completado. O período de organogênese é o mais susceptível à teratogênese, e a resposta teratogênica é determinada pelo período de desenvolvimento no qual ocorre a exposição, bem como com a toxicidade inerente do agente (BRENT; BECKMAN, 1990; HARBISON, 1980).

No rato o período de implantação, início de proliferação celular e pré diferenciação ocorre do 1° ao 8° dia de gestação. O período de organogênese se estende do 8° ao 16° dia de gestação e é nesse período que normalmente ocorre maior incidência de teratogênese no sistema esquelético, olhos, palato, sistema urogenital, cérebro, coração e artérias. A partir do 17° dia pós-concepção até o 21° dia (parto) o rato entra num período refratário, pois este é um período caracterizado por crescimento e maturação funcional (WILSON, 1965).



A susceptibilidade a teratogenicidade a diferentes agentes depende do estágio de desenvolvimento, tempo de exposição e dose empregada (BRENT; BECKMAN, 1994).

O imidocarb foi administrado no período organogênico de ratas prenhes, isto é, do 6º ao 15º dia de gestação. Durante o período de administração de ambas as doses do medicamento avalio-se o peso das fêmeas prenhes. O consumo de água foi medido durante o mesmo período nas fêmeas que receberam a dose de 2,5 mg/kg, Esses parâmetros foram adotados como índice para se verificar a toxicidade do produto. Neste sentido, retirou-se do peso corporal das fêmeas ao final da gestação aquele do útero gravídico, para o cálculo do peso real das fêmeas ao final da gestação. Procedeu-se da mesma forma com o ganho de peso, ou seja, fez-se a diferença entre o ganho de peso aos 21 dias e do 1º dia de gestação para obter-se o ganho de peso real. Estes dados indicam se uma determinada alteração é de origem materna ou de seus descendentes. Assim, não se detectaram diferenças entre os pesos e ganho de peso dos animais do grupo controle e dos grupos experimentais. A ausência destas diferenças nas fêmeas tratadas com as duas doses do dipropionato de imidocarb, em relação às ratas do grupo controle, é indicativo de ausência de toxicidade materna. Também não existiu diferença em relação ao consumo de água quando comparadas ratas do grupo controle com ratas que receberam a dose de 2,5 mg/kg. Esse dado final vem corroborar para a conclusão de que as doses do dipropionato de imidocarb utilizadas nesse trabalho, administradas no período de organogênese, não produziram toxicidade materna. Portanto, pode-se sugerir que as possíveis alterações na prole das ratas, que porventura forem, observadas não se devem a interferências com a homeostasia materna.

O peso do útero gravídico foi maior nos animais que receberam a dose de 2,5 mg/kg do dipropionato de imidocarb, se comparado aos animais que receberam a dose de 1,7 mg/kg e

animais do grupo controle. Do mesmo modo, o número de corpos lúteos e de implantações foi maior e a porcentagem de perda pré-implantação foi menor nos animais do grupo que recebeu 2,5 mg/kg, se comparado com aquele que recebeu 1,7 mg/kg do dipropionato de imidocarb e o grupo controle. No entanto, como o medicamento foi aplicado após a implantação dos filhotes, a redução na perda pré-implantação nos animais tratados com 2,5 mg/kg do dipropionato de imidocarb não está correlacionada ao tratamento empregado. Esses fatores em conjunto podem justificar o número de filhotes que foi maior deste grupo em relação aos demais grupos. Isso implica, portanto, num maior peso do útero gravídico para os animais que receberam a dose de 2,5 mg/kg acima mencionada. Em relação à porcentagem de perda pós-implantação (é um índice que determina a correlação entre os números de embriões que se implantaram e os que se desenvolveram normalmente) não se detectaram alterações estatisticamente significativas entre os grupos.

Agentes tóxicos ou mesmo fatores ambientais são capazes de alterar o peso fetal. Este efeito pode ser consequência de ação direta destes agentes/fatores sobre o conceito em desenvolvimento ou ao nível placentário (GOODMAN; JAMES; HARBISON, 1982).

Qualquer alteração da homeostasia fisiológica materna durante a gestação é capaz de influenciar o desenvolvimento embrionário e fetal. Substâncias químicas podem induzir distúrbios na fisiologia materna através de alterações no metabolismo de proteínas, gorduras e carboidratos, hipóxia, alteração da função renal, hepática ou de órgãos endócrinos (KHERA, 1984).

A concepção de homeostasia durante a gestação é quase que uma similaridade entre uma constante e profunda dinâmica natural da relação entre mãe e conceito. Várias adaptações

ocorrem com a mãe durante a gestação nos mamíferos, tais como, diminuição da resistência vascular sistêmica, aumento progressivo do volume do plasma em até 50 %, aumento em 30-50% do rendimento cardíaco, aumento da ventilação pulmonar, aumento de acima de 50 % na filtração glomerular, entre outros (DE RIJK; VAN ESCH; FLICK, 2002; GUYTON; HALL, 1997) . A placenta é um órgão temporário que se desenvolve na mãe durante a gestação. Todas essas mudanças no organismo materno, a placenta e o desenvolvimento de concepto não ocorrem independentemente, mas em conjunto. A gestação é um processo fisiológico que requer uma sincronização do sistema de órgãos. Sendo assim, qualquer fator que perturbe um ou mais que um dos constituintes desse conjunto levará a uma alteração na homeostasia desse sistema, e por conseguinte, ter-se-á falhas na reprodução as quais podem ser identificadas por meio de estudos de embriotoxicidade, teratogenicidade e letalidade da prole (CARNEY, 1997).

Morfologicamente a placenta pode ser definida como sendo a fusão das membranas fetais à membrana mucosa uterina. A placenta varia em estrutura e função entre as diferentes espécies e estágio da gestação (BRENT; BECKMAN, 1994). Os constituintes da membrana placentária e, portanto, o número de camadas entre mãe e feto, variam em função do tipo de placenta. A placenta epiteliochorial apresenta um maior número de camadas entre mãe e feto e está presente, por exemplo, em eqüinos e porcos. A placenta endotéliocorial apresenta um menor número de camadas se comparada a epiteliochorial e permite um contato mais próximo entre mãe e feto e ocorre, por exemplo, em cães e gatos. Já a placenta hemocorial permite um contato direto entre o sangue materno e o feto, o que concede um contato extremamente íntimo entre mãe e prole e apresentam este tipo de placenta, por exemplo, o homem, primatas não humanos, rato, camundongo e cobaia (porco da índia). O número de camadas que separa o sangue fetal do sangue materno pode levar a uma diferença no tempo de transporte de substâncias da mãe para o

feto, mas não implica no impedimento da passagem de substâncias da mãe para a prole (SLIKKER; MILLER, 1994). É raro uma substância atravessar a barreira placentária em uma espécie e não o fazer em outra (BRENT; BECKMAN, 1994).

A placenta apresenta diversas funções desde barreira protetora até ser a provedora da difusão de substâncias a partir do sangue materno para o sangue fetal, como por exemplo, de nutrientes, eletrólitos, gases, entre outros, além da difusão dos produtos de excreção do feto para a mãe. Quando uma substância é absorvida pela placenta ela pode ser: excretada sem ser biotransformada, interagir e comprometer a função da placenta, passar diretamente para o feto ou não. Quando biotransformada pode levar ou não a formação de uma substância tóxica para a placenta ou feto (GOODMAN; JAMES; HARBISON, 1982; GUYTON; HALL, 1997).

Devido às suas diversas funções, a placenta torna-se um órgão alvo para efeitos adversos de drogas, que conseqüentemente resulta no crescimento e desenvolvimento embrionário ou fetal anormal. Sendo assim, ela deve ser considerada como um possível mecanismo de teratogenicidade (GOODMAN; JAMES; HARBISON, 1982).

Portanto, é importante conhecer a permeabilidade e a condutância da difusão da membrana placentária. No início da gravidez a membrana placentária ainda é espessa porque não está plenamente desenvolvida. Portanto, a permeabilidade é baixa. Além disso, a área de superfície é pequena porque a placenta ainda não cresceu significativamente. Assim a condutância da difusão é inicialmente pequena. Por outro lado, na gravidez tardia a permeabilidade aumenta em conseqüência do adelgaçamento das camadas da membrana de difusão e a área de superfície torna-se maior por causa do crescimento, dando assim um elevado aumento da condutância placentária (GUYTON; HALL, 1997).

A permeabilidade da placenta a agentes químicos depende da espessura placentária como também de outras características placentárias como, por exemplo, sistema de transporte de substâncias, área de contato, constituintes lipoprotéicos das membranas, entre outros. Além disso, devem-se considerar ainda em relação à permeabilidade, fatores relacionados ao próprio agente, como, grau de ionização, lipossolubilidade, ligação a proteínas e peso molecular (SLIKKER; MILLER, 1994).

No presente trabalho notou-se que o peso dos fetos por ninhada foi maior nos animais que receberam a dose de 2,5 mg/kg, se comparados aos animais que receberam a dose de 1,7 mg/kg. O peso dos filhotes individual foi menor no grupo que recebeu a dose de 1,7 mg/kg, se comparado ao grupo que recebeu a dose de 2,5 mg/kg e grupo controle. Em contrapartida o peso da placenta individual e o peso da placenta por ninhada foram reduzidos nos animais do grupo experimental que receberam a dose de 2,5 mg/kg. Segundo a literatura, em estudos perinatais deve-se tomar a ninhada como unidade, pois os dados individuais de peso, malformações, etc, podem refletir a existência de heterogeneidade das ninhadas. Pode-se então concluir que houve alteração no peso fetal e no peso da placenta. Desta forma, é possível que o medicamento esteja atuando sobre a placenta retardando o seu desenvolvimento, comprovado pela redução de seu peso. Estes dados estão de acordo com recentes achados em nossos laboratórios. Almeida (2001) mostrou que a administração do dipropionato de imidocarb a éguas (2,4mg/kg) no início do período de organogênese (23<sup>o</sup> dia de gestação) reduziu o crescimento das vesículas embrionárias avaliado por ultrassonografia em relação a éguas não tratadas com o medicamento. A autora ainda mostra que o dipropionato de imidocarb produziu abortamento em éguas. A observação do aumento de peso dos filhotes que receberam a dose de 2,5 mg/kg poderia ser interpretada como

conseqüência de uma melhor condição física das fêmeas, pois essas também apresentaram um maior número de filhotes.

O termo defeito congênito refere-se a anormalidades morfológicas, bioquímicas e funcionais produzidas antes ou no nascimento. Defeitos congênitos podem não ser detectados ao nascimento, mas se detectados após, são atribuídos a alterações ou defeitos no desenvolvimento. A manifestação final pode ocorrer como desenvolvimento morfológico ou funcional anormal ou ainda, como um defeito discreto no comportamento e aprendizado. Se somente o indivíduo é afetado, isto é, se unicamente as células somáticas embrionárias são alteradas e não as células germinativas (espermatozóides e/ou óvulos), então o defeito não é hereditário. Agentes químicos podem afetar o desenvolvimento embrionário de maneira a produzir defeitos em um ou em vários sistemas orgânicos. Substâncias que causam defeitos no desenvolvimento fetal são chamadas de teratogênicas (HARBISON, 1980).

Os agentes químicos aos quais o conceito está exposto durante o período de desenvolvimento representam um risco potencial para a ocorrência de toxicidade, a qual pode variar não só em função da natureza e concentração do agente bem como através da interação do mesmo com outros fatores como espécie, estado nutricional, e especialmente, susceptibilidade individual. O agente pode ser embriotóxico levando a alteração reversível, sem conseqüências tardias ao indivíduo, ou teratogênico, levando a alteração irreversível, podendo ou não causar conseqüências que limitem a sobrevivência do indivíduo (HARBISON, 1980).

O processo de caracterização de muitos dos mecanismos de teratogênese incluem mutação, aberração cromossomal, interferência na mitose, alteração da integridade e da função do ácido nucléico, falta de precursores do metabolismo, alteração do metabolismo intermediário,

inibição enzimática, alteração do equilíbrio osmolar e mudanças nas características das membranas (BRENT; BECKMAN, 1990).

As tabelas 5 e 6 mostram que a exposição no período de organogênese não induziu malformações e/ou anomalias externas, ósseas e viscerais na prole das fêmeas. A tabela 7 mostra a avaliação do número de centros de ossificação da prole de ratas expostas às duas doses do parasiticida, demonstrando que houve diferença significativa em relação à ossificação total e esternébrio entre os animais do grupo que recebeu a dose de 2,5 mg/kg e o grupo controle. Isso pode indicar uma maior maturidade dos filhotes, que por sua vez levaria a um maior peso fetal dos filhotes que receberam a dose 2,5 mg/kg. Esse fato pode ser justificado como simplesmente um fato coincidente em relação ao maior número de filhotes e melhor condição física materna, sendo consistentes com aqueles previamente observados em cavalos, pois os potros oriundos de éguas tratadas com o imidocarb não apresentaram, ao nascer, alterações físicas (ALMEIDA, 2001). Além disso, essa maior maturidade dos filhotes demonstrada por um aumento da ossificação do esternébrio e logo maior ossificação total, também justifica um maior peso dos filhotes do grupo que recebeu a dose de 2,5 mg/kg do dipropionato de imidocarb. Quando a idade gestacional é conhecida, a avaliação da maturidade do esqueleto pode ser utilizada de maneira a caracterizar o desenvolvimento somático fetal (GLÖCKNER; SCHWARZ; JAHNE, 1991).

Por outro lado, a redução do peso placentário aliada à maior maturidade óssea da prole de ratos, pode ser interpretada de uma outra forma.

É no terço final da gestação que ocorre a maior parte da transferência de cálcio para a mineralização do esqueleto fetal. A mãe obtém esse cálcio através de um aumento da absorção de cálcio da dieta e reabsorção a partir dos ossos. O aumento da necessidade de cálcio parece ser

uma demanda uniforme para todos os mamíferos durante a gestação e lactação. Nos mamíferos, esta transferência de cálcio da mãe para a prole ocorre via transporte transplacentário de cálcio, durante o desenvolvimento fetal, ou através da secreção de cálcio no leite, durante a lactação. Essa transferência de cálcio significa um estresse para a homeostasia de cálcio materno (WYSOLMERSKI, 2002).

A homeostasia de cálcio nos fetos dos mamíferos é caracterizada por níveis de cálcio no soro fetal maior do que no materno. Para a manutenção da homeostasia de cálcio entre mãe e feto estão envolvidos fatores como o paratormônio (que é hipercalcemiante) materno e fetal, vitamina D, e receptores de cálcio maternos e fetais (KOVACS et al., 1998). O aumento da absorção de cálcio durante a gestação é considerado o maior determinante para a mineralização fetal. A absorção intestinal de cálcio é ATP dependente e apresenta uma absorção transcelular que é dependente de vitamina D. Portanto, fêmeas que apresentem maior energia ou maior absorção de cálcio intestinal apresentarão fetos com uma mineralização óssea mais acentuada, pois haverá uma quantidade maior de cálcio disponível para os fetos (RUMMENS et al., 2003).

O saco vitelino é uma membrana presente tanto em roedores como em eqüinos. Nos roedores, após a implantação e até 12º dias de gestação, o saco vitelino é o principal responsável por suprir as necessidades do feto e nesta espécie ocorre uma ligação direta entre o saco vitelino e a circulação materna (SLIKKER; MILLER, 1994). Nos eqüinos, o saco vitelino é de grande importância para o embrião do 11º ao 21º dia de gestação quando então ocorre a transição (entre 21º ao 40º dia de gestação) e predominância do saco alantóide (GINTHER, 1992). O saco vitelino é um importante fator para a teratologia, pois muitas substâncias podem exercer seus efeitos teratogênicos, agindo indiretamente sobre o transporte de substâncias importantes da mãe para o feto, levando assim a uma disfunção na atividade da placenta. O saco vitelino é o centro do



sistema placentário de transporte materno fetal. É responsável por funções como absorção de produtos e circulação de nutrientes, imunológica, síntese e secreção de proteínas, entre outras. Na membrana do saco vitelino são encontradas proteínas vitamina D dependentes e relacionadas ao transporte de cálcio. Sendo assim, uma ação de uma substância sobre o saco vitelino, indiretamente, levaria a uma disfunção no transporte de cálcio e, portanto, na mineralização óssea fetal (JOLLIE, 1990).

O dipropionato de imidocarb na dose de 2,5 mg/kg pode ter agido na fêmea promovendo uma melhora de suas condições físicas se comparada aos demais grupos, e com isso observou-se melhor absorção de nutrientes e outras substâncias necessárias para o desenvolvimento fetal, promovendo, assim, um melhor crescimento e uma maior maturidade dos filhotes, comprovados pelo aumento da ossificação do esternóbrio e ossificação total. Outro mecanismo seria uma ação do dipropionato sobre a placenta, sugerido pela redução de peso da placenta individual e por ninhada, promovendo uma facilitação da entrada de cálcio e com isso elevada mineralização óssea se comparada aos demais grupos.

Os presentes resultados mostraram que a administração do dipropionato de imidocarb na dose de 1,7 mg/kg e na dose de 2,5 mg/kg, não promoveu teratogênese na prole de ratas, porém observou-se redução no peso placentário e concomitante maior maturidade óssea dos fetos. As causas destas alterações são ainda obscuras e devem ser melhor investigadas. De qualquer forma, o achado nos parece importante considerando que as duas doses do antiparasitário são empregadas terapêuticamente, e que no caso de prenhez, não é benéfico para os fetos nascerem com maior peso e/ou maturidade óssea, pois assim podem ocorrer problemas no desenvolvimento do filhote, como também para as mães, pois essas alterações podem levar à partos distócicos. Acrescenta-se, ainda, que o imidocarb é empregado em equinos, bovinos e por último em cães e

que, Almeida (2001) mostra resultados similares em eqüinos aos deste trabalho. Além disto, a autora citou também a ocorrência de aborto após a aplicação do dipropionato de imidocarb.

Portanto, a possível existência de efeitos indesejáveis torna o emprego do dipropionato de imidocarb durante a gestação um uso questionável.

## 8 CONCLUSÕES

1. A administração a ratas de 1,7 mg/kg e 2,5 mg/kg do dipropionato de imidocarb no período organogênico não foi capaz de alterar o peso e o ganho de peso materno durante a gestação, indicando ausência de toxicidade materna.

2. No desempenho reprodutivo destas fêmeas notou-se maior número de filhotes por ninhada, aumento na média de peso individual dos filhotes por ninhada e diminuição na média de peso da placenta individual e na média de peso da placenta por ninhada, após o tratamento com 2,5 mg/kg do dipropionato de imidocarb.

3. A avaliação óssea e visceral não mostrou a existência de diferenças entre os resultados dos animais dos grupos controle e experimental. Porém, na contagem dos centros de ossificação encontrou-se maior ossificação total e número de esternóbrios, o que indica uma maior maturidade da prole de ratas tratadas com 2,5 mg/kg do dipropionato de imidocarb.

Assim, é possível que o dipropionato de imidocarb tenha atuado sobre a placenta retardando o seu desenvolvimento, porém sem modificar a viabilidade dos filhotes, os quais foram em maior número e de maior peso ao nascimento. Duas hipóteses podem justificar tais achados: uma melhor condição física materna ou ação deletéria sobre a placenta. A maior maturidade óssea dos filhotes, indicada por um aumento da ossificação total e de número de esternóbrios, também justificaria um maior peso ao nascimento.

## REFERÊNCIAS

ADAMS, L. G. Clinicopathological aspects of imidocarb dipropionate toxicity in horses. **Research in Veterinary Science**, v.31, p.54-61, 1981.

ALIVERTI, V.; BONANOMI, L.; GIAVINI, E. The extended of fetal ossification as an index of delayed development in teratogenic studies on the rat. **Teratology**, v. 20, p. 237-242, 1979.

ALMEIDA, R. C. **Dipropionato de imidocarb: avaliação comparativa de um novo esquema terapêutico para o tratamento da babesiose equina (B. equi) e da toxicidade perinatal em éguas**. 2001. 67 f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

ANDRADE, S. F. **Manual de Terapêutica veterinária**. 2. ed. São Paulo: Editora Roca, LTDA, 2002. 458 p.

BARBOSA, I. P.; BOSE, R.; PEYMANN, B.; FRIEDHOFF, K. T. Epidemiological aspects of equine babesiosis in a herd of horses in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 58, p. 1-8, 1995.

BOOTH, N. H.; MCDONALD, L. E. Chemotherapy of parasitic diseases. In: \_\_\_\_\_. **Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, 6. ed. Iowa: Iowa State University Press, 1983, p.962-967.

BÖSE, R.; JORGENSEN, W. K.; DALGLIESH, R. J.; FRIEDHOFF, K. T.; VOS, A. J. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. **Veterinary Parasitology**, v.57, p.61-74, 1995.

BRANDER, G. C.; PUGH, D. M.; BYWATER, R. J.; JENKINS, W. L. Antitrypanosome and Antiprotozoal drugs. **Veterinary Applied Pharmacology & Therapeutics**, 5. ed. London: Bailliere Tindall, 1991, p.571-572.

BRENT, R. L.; BECKMAN, D. A. Environmental Teratogens. **Bulletin of New York Academy of Medicine**, v. 66, n. 2, p. 123-163, 1990.

BRENT, R. L.; BECKMAN, D. A. The Contribution of Environmental Teratogens to Embryonic and Fetal Loss. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 37, n. 3, p. 646-670, 1994.

BRÜNING, A. Equine piroplasmiasis an update on diagnosis, treatment and prevention. **British Veterinary Journal**, v.152, n.2, p.139-151, 1996.

CARNEY, E. W. Maternal Physiological Disruption. In: KAVLOCK, R. J.; DASTON, G. P. **Drug Toxicity in Embryonic Development I**. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1997. p. 573-594.

CUNHA, W. C.; SILVA, S. S.; OSÓRIO, B. L.; DUTRA, C. L. Alterações hematológicas em eqüinos experimentalmente infectados com Babesia equi. **Ciência Rural**, v.28, n.2,p.283-286, 1998.

CUNHA, W. C.; SILVA, S. S.; PIMENTEL, C.A; DAPPER, E. Avaliação da frequência de eqüinos soropositivos a Babesia equi no Joquei Clube de Pelotas e em dois haras da zona sul do Rio Grande do Sul, RS. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, V. 5, n. 2, p. 119-122, 1996.

DE RIJK, E.P.; VAN ESCH, E.; FLICK, G. Pregnancy dating in the rat: placental morphology and maternal blood parameters. **Toxicology Pathology**, v. 30, n. 2, p. 271-282, 2002.

DE WALL, D. T. Equine piroplasmiasis: A review. **British Veterinary Journal**, v. 148, n. 1, p. 7-14, 1992.

DE WALL, D.T.; VAN HEERDEN, J. Equine babesiosis. In: COETZER, J.A.W.; THOMSON, G.R.; TUSTIN, R.C. **Infectious Diseases of Livestock**. New York: Oxford University Press, 1994. v. 1. p. 295-304.

DE WALL D. T.; VAN HEERDEN J.; POTGIETER, F. T. An investigation into the clinical pathological changes and serological response in horses experimentally infected with *Babesia equi* and *Babesia caballi*. **Onderstepoort Journal Veterinary Research**, v. 54, n. 4, p. 561-568, 1987.

ERBSLOH, J. K. E. Babesiosis in the Newborn Foal. **Journal of Reproduction and Fertility**, p.725-726, 1975. Suplemento 23.

FERREIRA, A. J. P.; DELL'PORTO, A. Agentes Antiprotozoários. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada a medicina veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 477-478.

FRERICHS, W. M.; ALLEN, P. C.; HOLBROOK, A. A. Equine piroplasmiasis (*Babesia equi*): Therapeutic trials of imidocarb dihydrochloride in horses and donkeys. **Veterinary Record**, v. 93, n. 1, p. 73-75, 1973.

FRERICHS, W. M.; HOLBROOK, A. A. Treatment of equine piroplasmiasis with imidocarb dipropionate. **Veterinary Record**, v. 95, n. 8, p. 188-189, 1974.

GINTHER, O. J. **Reproductive Biology of the Mare**. 2. ed. Madison: Equiservices, 1992. p. 345-418.

GLÖCKNER, R.; SCHWARZ, S.; JAHNE, F. Simple methods for the characterization of skeletal development of rat pups during the perinatal period as a parameter of maturity. **Anatomischer Anzeiger**, v. 173, p. 209-214, 1991.

GOODMAN, D.R.; JAMES, R.C.; HARBISON, R.D. Placental toxicology. **Food Chemistry Toxicology**, v. 20, p. 123-128, 1982.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Gravidez e Lactação. In: \_\_\_\_\_. **Tratado de Fisiologia Médica**, 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p. 941-953.

HARBISON, R.D. Teratogens. In: CASARETT, L.J.; DOULL, J. **Casarett and Doull's toxicology**. 2. ed. Nova York: Macmillan Publishing Co., Inc., 1980. p. 158-175.

HEUCHERT, C. M. S.; GIULLI JR, V.; ATHAIDE, D. F.; BÖSE, R.; FRIEDHOFF, K. T. Seroepidemiologic studies on Babesia equi and Babesia caballi infections in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 85 , p. 1-11, 1999.

IBÁÑEZ, E.; GIMÉNEZ, R. L.; ZENOCRATI, L. G. R. Aspectos clinicos y morfologicos de la Babesia caballi y Babesia equi. **Gaceta Veterinaria**, n. 342, p. 422-429, 1979.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Quantidade de animais - unidades - senso 2000. Disponível em <[http:// www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/default.asp](http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/default.asp)>. Acesso em: 04 jun. 2002.

JOLLIE, W. P. Development, morphology and function of the yolk-sac placenta of laboratory rodents. **Teratology**, v. 41, p. 361-381, 1990.

KHERA, K.S. Maternal toxicity: A possible etiological factor in embryo-fetal deaths and fetal malformations of rodent-rabbit species. **Teratology**, v. 31, p. 129-153, 1985.

KHERA, K. S. Maternal Toxicity – A possible factor in fetal malformations in mice. **Teratology**, v. 29, p. 411-416, 1984.

KOVACS, C. S.; HO-PAO, C. L.; HUNZELMAN, J. L.; FOX, J.; SEIDMAN, C. E.; KRONENBERG, H. M. Regulation of murine fetal-placental calcium metabolism by the calcium-sensing-receptor. **Journal Clinical Investigation**, v. 101, n. 12, p. 2812-2820, 1998.

KUTTLER, K. L.; JOHNSON, L. W. Chemoprophylactic activity of imidicarb, diminazene and oxytetracycline against Babesia bovis and B. bigemina. **Veterinary Parasitology**, v. 21, n. 2, p. 107-118, 1986.

KUTTLER, K. L.; ZAUGG, J. L.; GIPSON, C. A. Imidocarb and parvaquone in the treatment of piroplasmosis (*Babesia equi*) in equids. **American Journal of Veterinary Research**, v. 48, n. 11, p. 1613-1616, 1987.

LEVINE, N. D. Apicomplexa: The Piroplasms. **Veterinary Protozoology**, 1. ed. Iowa: Iowa State University Press, 1985. p. 291-313.

MAHONEY, D. F.; WRIGHT, I. G.; FRERICHS, W. M.; GROENENDYK, S.; O'SULLIVAN, B. M.; ROBERTS, M. C.; WADDELL, A. H. The identification of *Babesia equi* in Australia. **Australian Veterinary Journal**, v. 53, p. 461-464, 1977.

PHIPPS, L.P. Equine piroplasmosis. **Equine Veterinary Education**, v. 8, n. 1, p. 33-36, 1996.

RIBEIRO, M. F. B.; SAITO, J. F.; PIMENTEL, P. V.; JUNQUEIRA, L. A. C.; LOPES, M. A. F. Babesiose eqüina I – Primo-infecção de potros em área endêmica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 47, n. 5, p. 641-647, 1995.

RISTIC, M.; KREIER, J. P. **Babesiosis**. New York: Academic Press, 1981, 589p.

RUMMENS, K.; VAN CROMPHAUT, S. J.; CARMELIET, G.; VAN HERCK, E.; VAN BREEE, R.; STOCKMANS, I.; BOURLLON, R.; VERHAIGHI, J. Pregnancy in mice lacking the vitamina D receptor: normal maternal skeletal response but fetal hypomineralization rescued by maternal calcium supplementation. **Pediatric Research**, v. 54, n. 4, p. 466-473, 2003.

SCHARDEIN, J. L.; SCHWETZ, B. A.; KENEL, F. K. Species sensitivities and prediction of teratogenic potencial. **Environmental Health Perspectives**, v. 61, p.55-67, 1985.

SHAH-FISCHER, M.; SAY, R. R. Tick-Borne Diseases. In: \_\_\_\_\_. **Manual of Tropical Veterinary Parasitology**, Wallingford: CAB International, 1989, p.353-390.



SIMPSON, C. F.; NEAL, F. C. Ultrastructure of *Babesia equi* in ponies treated with imidocarb. **American Journal of Veterinary Research**, v. 41, n. 2, p. 267-271, 1980.

SIMPSON, C. F.; TAYLOR, W. J.; KITCHEN, H. Crystalline inclusions in erythrocytes parasitized with *Babesia equi* following treatment of ponies with imidocarb. **American Journal of Veterinary Research**, v. 41, n. 8, p. 1336-1340, 1980.

SLIKKER, W. J.; MILLER, R. K. Placental metabolism and transfer. In: KEMMEL, C.A.; BUELKE-SAM, J. **Developmental Toxicology**. 2. ed. Nova York: Raven Press, Ltda, 1994. p. 245-271.

SMITH, J. E.; ERICKSON, H. H.; DEBOWES, R. M. Changes in circulating eqine erythrocytes induced by brief high-speed exercise. **Equine Veterinary Journal**, v. 21, n. 6, p. 444-446, 1989.

STAPLES, R. E.; SCHENELL, V. L. Refinements in rapid technic in the KOH-alizarin red S method for fetal bone. **Stain Technology**, v. 39, p. 61-63, 1964.

STOBBE, N. S.; BRACCINI, G. L.; CANTO, J. I.; CHAPLIN, E. L.; ARAÚJO, F. A. P.; SILVA, M. R. S. Detecção de *Babesia equi* em eqüinos clinicamente sadios de Porto Alegre, RS. **Arquivos da Faculdade de Veterinária**, UFRGS, v. 20, p. 250-256, 1992.

STOBBE, N. S.; SILVA, N. R. S.; CHAPLIN, E.L.; ARAÚJO, F. A. P.; TELLES, A.; VARGAS, M. Ocorrência de *Babesia caballi* e *Babesia equi* detectadas pela distensão de gota de coágulo de sangue, em eqüinos de campo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 26, n. 4, p. 565-567, 1991.

URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L.; DUNN, A. L.; JENNINGS, F. W. Protozoologia Veterinária. In: \_\_\_\_\_. **Parasitologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1990. p. 255-263.

WILSON, J. G. Embriological Considerations in Teratology. In: WILSON, J.G.; WARKANY, J. **Teratology-Principes and Techniques**. Chicago: The University of Chicago Press, 1965. p. 251-261.

WYSOLMERSKI, J. J. The evolutionary origins of maternal calcium and bone metabolism during lactation. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 7, n. 3, p. 267-276, 2002.