

Efeitos do Uso Crônico do Amprenavir sobre a Prenhez da Rata Albina

Effects of Chronic Amprenavir Treatment on Rat Pregnancy

Dunya Rodrigues Mota¹, Manuel de Jesus Simões¹, Abês Mahmed Amed¹
Adelino Moreira de Carvalho¹, Ricardo Martins de Oliveira-Filho², Luiz Kulay Júnior¹

RESUMO

Objetivo: avaliar o efeito do uso crônico do amprenavir sobre as implantações, reabsorções, fetos, placentas e mortalidade materna e fetal da rata albina.

Métodos: 5 grupos de ratas albinas EPM-1 Wistar, prenhes, foram usados: 2 controles, Contr1 (controle do estresse) e Contr2 (controle do veículo), e três grupos experimentais, Exper1, Exper2 e Exper3, que receberam, respectivamente, 46, 138 e 414 mg/kg de peso de solução oral de amprenavir. Droga e veículo (propilenoglicol) foram ministrados por gavagem. Foram avaliados a evolução ponderal, número de implantações, de reabsorções, de fetos, de placentas e de óbitos intra-uterinos, o peso dos fetos e das placentas e malformações maiores. Foram retirados fragmentos de pulmões, rins, fígado e intestinos para avaliação histopatológica.

Resultados: observou-se, no grupo Exper3, tendência a menor ganho de peso materno durante a prenhez ($p=0,07$), mas o amprenavir não causou efeitos deletérios sobre o conteúdo intra-uterino. O efeito citotóxico da droga revelou-se nas análises histopatológicas de vísceras das ratas prenhes e na taxa de mortalidade materna: 50% nos grupos Exper1 e Exper2 e 70% no grupo Exper3.

Conclusão: o amprenavir, em todas as doses administradas, mas especialmente na dose de 414 mg/kg de peso, mostrou ter efeito deletério sobre os pulmões, intestinos, rins e fígado maternos e aumentou significativamente o percentual de mortalidade materna.

PALAVRAS-CHAVE: Drogas anti-retrovirais. AIDS. Estudo experimental. Malformações.

Introdução

Desde o seu reconhecimento como entidade nosológica, há cerca de duas décadas, a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA, ou AIDS) representa um desafio médico, devido a sua alta taxa de mortalidade e ao número cada vez maior de indivíduos infectados.

Inicialmente conhecida como “doença dos homossexuais”, desde 1993 a transmissão heterossexual passou a ser a principal forma de disseminação do vírus HIV no Brasil, aumentando consideravelmente o número de mulheres infectadas.

Estima-se que, dos 42 milhões de infectados vivendo sob o binômio HIV/AIDS, 19,2 milhões correspondam a mulheres adultas¹. No Brasil, no período de 1980 a 2002, o número de mulheres em idade fértil infectadas pelo HIV representou 85,5% dos casos de AIDS na população feminina. A incidência de gestantes soropositivas vem aumentando significativamente, segundo o Ministério da Saúde. No país existem cerca de 17 mil gestantes HIV-positivas².

O fenômeno de “feminização” da doença, principalmente em idade fértil, implica um número cada vez maior de crianças infectadas por meio da transmissão materno-fetal (TMF) ou transmissão vertical, sendo esta a principal via de infecção pelo HIV em crianças. No Brasil, até 2002, 86,1% dos casos de infecção pelo HIV, verificados em menores de 13 anos, decorrem de TMF durante o ciclo gravídico-puerperal².

Desde o estudo do *Pediatric AIDS Clinical Group*, conhecido como Protocolo 076 (ACTG 076), que demonstrou queda da TMF em 70% com a ad-

¹Departamento de Obstetrícia – Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina – São Paulo – SP – Brasil.

²Departamento de Farmacologia – Universidade de São Paulo – Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo – SP – Brasil.

Correspondência:
Luiz Kulay Júnior

Rua Doutor Altino Arantes nº 1000, apto 203 - V. Clementino
04042-004 - São Paulo - SP

Fone: (11) 3285-4627

e-mail: kulay.toco@epm.br

ministração de zidovudina (AZT) à gestante³, os benefícios da terapia anti-retroviral vêm sendo amplamente estudados em associação com outras intervenções, como a cesárea eletiva e a orientação para supressão do aleitamento materno, a fim de reduzir a TMF^{4,5}.

Embora inicialmente preconizada a monoterapia com AZT, há recomendações recentes de que as gestantes não devem ser privadas do uso de combinações de drogas potentes⁶, visto que atualmente esses esquemas estão relacionados a menor taxa de TMF⁷. Atualmente, cada vez mais, observa-se a tendência para manter o mesmo esquema que vinha sendo utilizado antes da gestação, exceto em casos de drogas reconhecidas teratogênicas^{6,8}.

O amprenavir é um anti-retroviral inibidor de protease de introdução recente na terapêutica, e não existem estudos bem controlados que avaliem o seu uso em gestantes ou suas repercussões sobre os conceitos. Deste modo, o presente trabalho averigua os possíveis efeitos adversos deste fármaco administrado durante toda a prenhez da rata albina.

Material e Métodos

Utilizamos ratas albinas (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem EPM-1 Wistar, virgens, com 90 dias de vida, pesando em torno de 230 g, com regime de alimentação (ração Nuvital CR-1) e água *ad libitum*. Foram inicialmente acasaladas na proporção de três fêmeas para cada macho, por período de duas horas. O início da gestação (dia zero da prenhez) foi confirmado pelo encontro de espermatozoides na luz vaginal⁹. Cinquenta ratas prenhes foram divididas, aleatoriamente, nos seguintes 5 grupos numericamente iguais: Contr1, animais não manipulados; Contr2, animais que receberam 0,5 mL de propilenoglicol; Exper1, Exper2 e Exper3, animais tratados, respectivamente, com 46, 138 e 414 mg/kg de peso corporal de solução oral de amprenavir. O veículo e a droga foram administrados por gavagem, uma vez ao dia, sempre na parte da manhã, a partir do dia zero até o 20º dia da prenhez.

O ganho de peso dos animais foi monitorado por meio de pesagem nos dias zero, 7º, 14º e 20º de prenhez. Ao termo (20º dia), todos os animais foram anestesiados com mistura de xilazina com ketamina (Rompun® e Francotar®), 0,05 mL de cada uma, por via intraperitoneal. Após laparotomia e histerotomia, avaliaram-se os seguintes parâmetros: número de implantações, de

reabsorções, de fetos vivos e mortos, bem como o peso dos fetos e placentas. Os fetos foram detalhadamente investigados sob lupa estereoscópica quanto à ocorrência de malformações maiores externas. Em seguida, as matrizes foram submetidas a necrópsia e retirados fragmentos de vários órgãos (pulmões, fígado, intestinos e rins), os quais foram imediatamente mergulhados em formol a 10% e processados para análise histológica. Os cortes obtidos foram corados pela hematoxilina e eosina (HE).

Os resultados, após análise de variância, foram analisados por comparações múltiplas pelo teste de Kruskal-Wallis. Para os cálculos, foi utilizado o *software* GraphPad Instat®, versão 2.01.

Resultados

O ganho porcentual de peso das ratas foi avaliado no 7º, 14º e no 20º dia de prenhez (Figura 1). Os resultados mostraram que o maior ganho de peso ocorreu no intervalo compreendido entre o 14º e o 20º dia. Embora não significativa, o grupo que ganhou menos peso no último período foi o grupo Exper3.

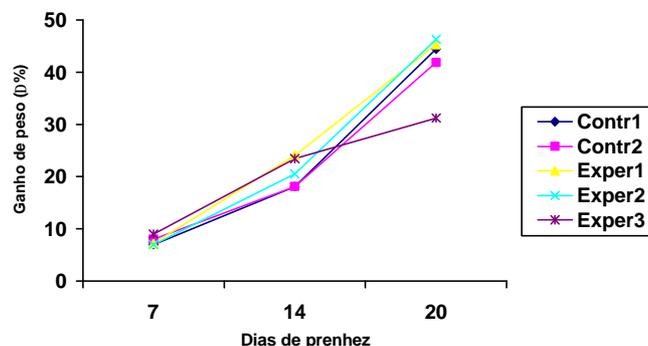


Figura 1 - Evolução do ganho de peso em ratas, controles (Contr1 = controle estresse e Contr2 = controle veículo) e tratadas com doses crescentes de amprenavir (Exper1 = 46 mg/kg, Exper2 = 138 mg/kg e Exper3 = 414 mg/kg) durante toda a prenhez (n=10 em todos os grupos).

Quando ao número de implantações verificase que no grupo Contr1 o número médio foi de 10,3 contra 10,3 no grupo Contr2 e variou de 10,0 a 12,2 nos grupos experimentais. A média de reabsorções foi de 0,3 (Contr1), 0,1 (contr2) e variou de 0 a 4 nos grupos experimentais. Os pesos dos fetos foram também semelhantes nos vários grupos: 4,1 (Contr1 e Contr2) e variou de 4,0 a 4,7 nos demais. O peso das placentas variou entre 0,6 e 0,7 em todos os grupos. Estes resultados mostram que não houve diferença significativa entre os diversos grupos do experimento (Tabela 1).

Tabela 1 - Efeitos do amprenavir sobre o número de implantações e de reabsorções, sobre o peso dos fetos e das placentas e sobre mortalidade materna^a.

	Contr1	Contr2	Exper1	Exper2	Exper3
Nº de implantações	10,3 ± 0,44	10,3 ± 0,73	11,0 ± 0,44	12,2 ± 0,48	10,0 ± 0,44
Nº de reabsorções	0,3 ± 0,21	0,1 ± 0,10	0,2 ± 0,20	–	4,0 ± 4,00
Peso dos fetos (g)	4,1 ± 0,10	4,1 ± 0,06	4,0 ± 0,11	4,3 ± 0,14	4,7 ± 0,75
Peso das placentas (g)	0,6 ± 0,02	0,6 ± 0,02	0,6 ± 0,02	0,7 ± 0,03	0,6 ± 0,05
Mortalidade materna (%)	–	–	50 ± 16	50 ± 16	70 ± 15*

^aGrupos de 10 animais tratados com veículo (Contr2 = propilenoglicol) ou solução oral de amprenavir durante toda a prenhez (Exper1 = 46 mg/kg; Exper2 = 138 mg/kg; Exper3 = 414 mg/kg), Contr1 = sem manipulação (controle de estresse).

*p < 0,05 em relação aos grupos Contr1 e Contr2.

Dados apresentados como média ± erro padrão da média.

Os índices de mortalidade materna, nos grupos estudados, também estão expressos na Tabela 1. Houve expressiva mortalidade materna em todos os grupos tratados (50 ± 16% nos grupos Exper1 e Exper2, e 70 ± 15% no grupo Exper3); contudo, apenas no grupo tratado com a dose maior (Exper3) o valor alcançou significância estatística.

A análise histológica mostrou comprometimento de alguns órgãos em vários graus de intensidade, à microscopia de luz, em todos os grupos experimentais, sendo mais intensa no grupo Exper3. Nos pulmões, observaram-se lesão alveolar difusa, congestão, edema e hemorragia; no intestino, verificaram-se necrose e descamação epitelial; no fígado, observaram-se focos de necrose e esteatose e, nos rins, necrose tubular segmentar.

Discussão

O amprenavir é inibidor de protease viral com especificidade para o vírus HIV, cujo perfil de resistência a esse fármaco parece ser diferente do de outros congêneres, pois sua eficácia permanece por mais de 24 horas. Esta é a razão para dose única diária. Estudos clínicos mostram como principais efeitos colaterais do amprenavir: *rash* cutâneo, cefaléia, diarreia e perda de peso, mas pouco se sabe sobre as repercussões desse fármaco sobre a gestação. Neste trabalho, encontrou-se que a dose mais alta, ou seja, 414 mg/kg de peso corpóreo, apresentou efeitos indesejáveis como redução do ganho de peso e o aumento da mortalidade materna, numa primeira indicação para potenciais efeitos deletérios sobre a gestação da rata.

A dose de amprenavir administrada no grupo Exper1 foi proporcionalmente semelhante à recomendada para uso terapêutico em humanos, isto é, 46 mg/kg de peso corporal por dia. Os grupos Exper2 e Exper3 foram tratados com doses 3 e 9 vezes superiores à dose menor, em primeiro lugar porque o metabolismo hepático da rata estima-se

ser três vezes mais eficiente do que aquele encontrado em humanos e a depuração renal (*clearance*) desses animais é duas vezes mais eficiente.

Os grupos que receberam amprenavir com doses de até 138 mg/kg (Exper1 e Exper2) apresentaram ganho de peso regular durante a gestação, não tendo havido ganho significativamente diferente do observado nos controles (Contr1 e Contr2). No grupo que recebeu 414 mg/kg (Exper3) os animais tiveram menor ganho de peso, em especial no último período da gestação. Observaram-se índices de 50% de mortalidade materna nos grupos Exper1 e Exper2, e de 70% no grupo Exper3; além disto, houve grande número de reabsorções de conceptos nas ratas sobreviventes deste grupo. Tomados em conjunto, estes dados sugerem alto potencial tóxico do amprenavir para a prenhez da rata albina. Em humanos, o amprenavir está relacionado a intensas reações cutâneas, havendo também relatos de mortes em pacientes em uso desse fármaco, o que se estima em, aproximadamente, 1% dos casos¹⁰.

A taxa da passagem transplacentária do amprenavir, apesar de seu modesto peso molecular (505 Da), é extremamente baixa devido, provavelmente, ao bloqueio promovido pela glicoproteína P, proteína de transporte transmembrana que existe em grande concentração junto à placenta; o mesmo tipo de bloqueio parece ocorrer também com o ritonavir, outro bloqueador de protease¹¹⁻¹³. Tal fato pode explicar porque não temos observado efeitos deletérios do fármaco sobre o número de implantações e de reabsorções do experimento, como também sobre o peso dos fetos e das respectivas placentas nos grupos experimentais. A mesma ausência de efeitos no tocante ao conteúdo intra-uterino foi observada em estudo experimental similar usando ritonavir, provavelmente também em função da restrição da passagem transplacentária do fármaco promovida pela glicoproteína P^{14,15}.

As lesões hepáticas e renais nos grupos tratados com amprenavir sugerem, em função da presumível piora da metabolização e da depuração do fármaco, aumento de sua biodisponibilidade.

A consequência imediata deste fato seria a potencialização de seus efeitos farmacológicos, com duas vertentes antagônicas: por um lado, em pacientes infectados haveria aumento da eficácia antiviral, e por outro, haveria deterioração das funções hepato-renais e aumento dos efeitos tóxicos sistêmicos próprios da droga (explicando, por exemplo, os efeitos observados neste trabalho sobre a mortalidade materna e sobre as reabsorções dos conceptos). Vale ressaltar, entretanto, que estas alterações podem ser espécie-específicas, e não devem ser transportadas, em primeira instância, para o ser humano. De qualquer forma, essas considerações podem contribuir para alertar o profissional médico para os cuidados especiais no monitoramento do uso dessa droga, especialmente no tocante a funções viscerais, particularmente quanto à função hepática e à função renal, promovendo a avaliação sistemática, periódica e freqüente do paciente, notadamente nas pacientes grávidas em eventual uso do amprenavir.

Embora já se soubesse que os inibidores de protease (indinavir, nelfinavir, ritonavir) podem desencadear resistência insulínica por inibição do transportador de glicose responsivo a insulina GLUT4^{16,17}, mais recentemente comprovou-se que o amprenavir apresenta potente efeito redutor da liberação de insulina sobre ilhotas pancreáticas isoladas¹⁸. Este fato agrava-se com a exposição prolongada e não é plenamente reversível após a retirada da droga^{17,18}. Estes dados sugerem que exposição prolongada à terapia anti-retroviral de alta eficácia pode contribuir significativamente para o desenvolvimento de diabetes franco e têm duas consequências: primeiro, podem explicar, pelo menos em parte, os efeitos deletérios do amprenavir observados neste trabalho; segundo, chamam a atenção para o desenvolvimento de novas gerações de drogas anti-retrovirais que mantenham sua eficácia clínica em regimes de tratamento crônico sem causar efeitos metabólicos adversos, especialmente na gravidez.

ABSTRACT

Objective: *to evaluate the chronic effects of amprenavir on implantations, reabsorptions, fetuses, placentae, and maternal and fetal mortality in the albino rat.*

Methods: *five groups of EPM-1 Wistar pregnant rats were used: two controls: Contr1 (control of stress) and Contr2 (drug vehicle control), and 3 experimental groups that were treated once a day throughout gestation with 46mg/kg (Exper1), 138mg/kg (Exper2) and 414mg/kg (Exper3) of oral solution of amprenavir. The drug and the vehicle (propyleneglycol) were administered by gavage. The evaluations included maternal body weight*

gain, number of implantations, reabsorptions, fetuses, placentae and of intrauterine deaths as well as fetal and placental mean weight and major malformations. Fragments of lungs, kidneys, liver and intestines were collected and prepared for histopathological evaluation.

Results: *Exper3 group tended to show lesser maternal body weight gain during gestation (P = 0.07), but amprenavir did not affect the intrauterine contents. The cytotoxic effect of the drug was observed with regard to the histopathological analyses of pregnant rat viscerae and to the maternal mortality rate: 50% in Exper1 and Exper2 groups, and 70% in Exper3 group.*

Conclusion: *amprenavir exerted adverse side effects on maternal lung, gut, kidney and liver, and significantly increased maternal mortality rates in all administered doses and especially at 414 mg/kg.*

KEY WORDS: *Anti-retroviral drugs. Aids. Experimental study. Malformation.*

Referências

1. World Health Organization. AIDS epidemic update. [online] 2002 Dec [cited 2003 Jan 21]: [45 screens]. Available from: URL: <http://www.unaids.org/worldaidsday/2002/press/update/epiupdate-2002-en.doc>
2. Ministério da Saúde. Coordenação Nacional DST/AIDS. Dados epidemiológicos do Brasil. Bol Epidemiol Aids [online] 2002 [citado 20 jul 2003];16(2):[12 telas]. Disponível em: URL: <http://www.aids.gov.br>
3. Connor EM, Sperling RS, Gelber R, et al. Reduction of maternal-infant transmission of human immunodeficiency virus type 1 with zidovudine treatment. N Engl J Med 1994; 331:1173-80.
4. Buccheri AM, Somigliana E, Matrone R, et al. Combination antiretroviral therapy in 100 HIV-1-infected pregnant women. Hum Reprod 2002; 17:436-41.
5. The Italian Register for Human Immunodeficiency Virus Infection in Children. Determinants of mother-to-infant human immunodeficiency virus type 1 transmission before and after the introduction of zidovudine prophylaxis. Arch Pediatr Adolesc Med 2002; 156:915-21.
6. Centers for Disease Control and Prevention. US Public Health Service Task Force. Recommendations for use of antiretroviral drugs in pregnant HIV-1 infected women for maternal health and interventions to reduce perinatal HIV-1 transmission in the United States [online]. Washington; 2002. [cited 2002 Out 30]: [159 screens]. Available from: URL: <http://www.aidsinfo.nih.gov/guidelines/perinatal/perinatal-083002.html>

7. Cooper ER, Charurat M, Mofenson L, et al. Combination antiretroviral strategies for the treatment of pregnant HIV-1 infected women and prevention of perinatal HIV-1 transmission. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002; 29:484-94.
8. Taylor GP, Low-Beer N. Antiretroviral therapy in pregnancy: a focus on safety. *Drug Saf* 2001; 24:683-702.
9. Hamilton JB, Wolf JM. The effect of male hormone substance upon birth and prenatal development in the rat. *Anat Rec* 1938; 70:433-40.
10. Rotunda A, Hirsch RJ, Scheinfeld N, Weinberg JM. Severe cutaneous reactions associated with the use of human immunodeficiency virus medications. *Acta Derm Venereol* 2003; 83:1-9.
11. Smit JW, Huisman MT, van Tellingen O, Wiltshire HR, Schinkel AH. Absence or pharmacological blocking of placental P-glycoprotein profoundly increases fetal drug exposure. *J Clin Invest* 1999; 104:1441-7.
12. Huisman MT, Smit JW, Crommentuyn KM, et al. Multidrug resistance protein 2 (MRP2) transports HIV protease inhibitors, and transport can be enhanced by other drugs. *AIDS* 2002; 16:2295-301.
13. Marzolini C, Rudin C, Decosterd LA, et al. Transplacental passage of protease inhibitors at delivery. *AIDS* 2002; 16:889-93.
14. Carvalho AM. Ação crônica do ritonavir durante a prenhez da rata albina (*Rattus norvegicus albinus*, Rodentia, Mammalia). Repercussões sobre a performance reprodutiva e o resultado perinatal [tese]. São Paulo: Univ. Federal de São Paulo; 2003.
15. Mirochnick M, Dorenbaum A, Holland D, et al. Concentrations of protease inhibitors in cord blood after in utero exposure. *Pediatr Infect Dis J* 2002; 21:835-8.
16. Murata H, Hruz PW, Mueckler M. The mechanism of insulin resistance caused by HIV protease inhibitor therapy. *J Biol Chem* 2000; 275:20251-4.
17. Murata H, Hruz PW, Mueckler M. Indinavir inhibits the glucose transporter isoform Glut4 at physiologic concentrations. *AIDS* 2002; 16:859-63.
18. Koster JC, Remedi MS, Qiu H, Nichols CG, Hruz PW. HIV Protease inhibitors acutely impair glucose-stimulated insulin release. *Diabetes* 2003; 52:1695-700.

Recebido em: 21/8/2003

Aceito com modificações em: 16/1/2004

CONCURSO

PARA OBTENÇÃO DO CERTIFICADO DE ATUAÇÃO NA ÁREA DE:

SEXOLOGIA

PERÍODO PARA ENVIO DO CURRÍCULUM:

15/04/2004 A 14/06/2004



EDITAL E FICHA DE INSCRIÇÃO:
Retirar na *Home Page* da FEBRASGO

www.febrasgo.org.br

ENVIAR PARA SECRETARIA EXECUTIVA DA FEBRASGO:

**Av. das Américas, 8445 - sala 711
Barra da Tijuca - Rio de Janeiro - RJ
22793-081
Tel.: (0xx21) 2487-6336**