

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
SERGIO AROUCA
ENSP

Klaus Magno Becker

**Desenvolvimento somático e neurocomportamental da prole de ratas tratadas com o
antimalárico primaquina durante a gravidez**

Rio de Janeiro

2017

Klaus Magno Becker

Desenvolvimento somático e neurocomportamental da prole de ratas tratadas com o antimalárico primaquina durante a gravidez

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Saúde Pública na área de concentração: Abordagem Ecológica de Doenças Transmissíveis.

Orientador: Prof. Dr. Francisco José Roma Paumgarten

Rio de Janeiro

2017

Catálogo na fonte

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde

Biblioteca de Saúde Pública

B395d Becker, Klaus Magno.
Desenvolvimento somático e neurocomportamental da prole
de ratas tratadas com o antimalárico primaquina durante a
gravidez / Klaus Magno Becker. -- 2017.

50 f. ; tab. ; graf.

Orientador: Francisco José Roma Paumgarten.
Dissertação (mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Escola
Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2017.

1. Primaquina - uso terapêutico. 2. Crescimento e Desenvolvimento.
3. Ratos Wistar. 4. Placenta - metabolismo. 5. Antimaláricos. I. Título.

CDD – 22.ed. – 616.9362

Klaus Magno Becker

Desenvolvimento somático e neurocomportamental da prole de ratas tratadas com o antimalárico primaquina durante a gravidez

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Saúde Pública na área de concentração: Abordagem Ecológica de Doenças Transmissíveis.

Orientador: Prof. Dr. Francisco José Roma Paumgarten

Aprovada em: 26 de maio de 2017 .

Banca Examinadora

Prof. Dr. Francisco José Roma Paumgarten

Fundação Oswaldo Cruz - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Prof.^a Dra. Ana Cecília Amado Xavier de Oliveira

Fundação Oswaldo Cruz - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Prof. Dr. Davyson de Lima Moreira

Fundação Oswaldo Cruz - Laboratório Farmacêutico Federal - Farmanguinhos

Rio de Janeiro

2017

AGRADECIMENTOS

Eu devo a conclusão deste trabalho a determinadas pessoas e é aqui que eu tento homenageá-las, a minha maneira, mesmo sendo singela essa homenagem a minha gratidão é grande e eu espero que isso não baste a elas, espero que me cobrem mais carinho e amor, que talvez assim eu seja capaz de sanar minha dívida com elas.

A primeira e mais importante delas é a Paula Daniela Souza Alves, minha companheira fiel e inestimável, me ajudou a superar a angústia de ver meus colegas seguindo seu rumo na vida acadêmica enquanto eu estagnava no desafio do processo seletivo para o mestrado, ela me ajudou a escolher o programa de mestrado e me incentivou a estudar para a prova, me fazendo superar o quadro decadente que eu me encontrava.

A segunda pessoa mais merecedora da minha gratidão é a Rosangela Ribeiro de Carvalho, essa pessoa sempre me empurrou pra frente quando minha procrastinação ocupava minha mente, desde que passei a ser um membro do laboratório, e quando ela teve oportunidade de me ajudar no projeto ela me pegou pela mão e me ensinou tudo que pôde sem descanso nem fins de semanas ou feriados.

Para além disso, preciso agradecer meu orientador por me aceitar no laboratório, mesmo não tendo algo de bom para basear seu julgamento sobre mim.

Agradeço a minha amiga Thais Rolim, que realizou as análises de cromatografia de todo o projeto.

Agradeço muito aos meus colegas de turma, e professores que enriqueceram muito minha visão do mundo, meus questionamentos, minha argumentação e meus paradigmas. Em especial o Leonardo Eberhardt, e que a nossa amizade seja a coisa mais valiosa que eu levo deste mestrado.

E agradeço aos meus colegas de laboratório, Helen, Rafael, Davyson e toda a equipe.

Sou muito grato a minha mãe Claudia Becker e meu pai Ernesto Becker por muitíssimos motivos, mas estes não se relacionam a realização deste trabalho.

Não houve nenhuma participação de qualquer entidade sobrenatural, na realização deste trabalho. Portanto os agradecimentos se encerram aqui.

RESUMO

A primaquina é o único fármaco que promove a cura radical da doença causada por *P. vivax* e possivelmente também por *P. ovale*, porém possui diversos problemas em se utilizar a primaquina durante a gravidez, pois é um fármaco capaz de penetrar a placenta, e por não se conhecer o estado de enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6DP) do feto, a metabolização do fármaco no feto pode ser deficitária. No entanto não tem se pesquisado que problemas essa terapia pode causar a uma gravidez e a prole, o ineditismo do trabalho contribui para o campo de estudo por elucidar os desafios que tal terapia enfrentaria. Nesse estudo foi visto que a primaquina não é capaz de ser transmitida para a prole através da amamentação, e que não afetou os parâmetros de desenvolvimento e crescimento dos jovens expostos intra-utero ao fármaco, mas teve efeito na sobrevivência dos filhotes e no comportamento no teste de campo aberto (*open-field*).

Palavras-chave: Primaquina. Desenvolvimento. Intra-utero. Campo aberto.

ABSTRACT

Primaquine is the only drug that promotes the radical cure of the disease caused by *P. vivax* and possibly also by *P. ovale*, but has several problems in using primaquine during pregnancy, since it is a drug capable of penetrating the placenta, and by not knowing the state of the enzyme glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) of the fetus, the fetus in drug metabolism may be deficient. However, it has not been investigated what problems this therapy can cause to a pregnancy and the offspring, the novelty of the work contributes to the field of study to elucidate the challenges that such therapy would face. In this study, primaquine was not able to be transmitted to the offspring through breastfeeding, and did not affect the developmental and growth parameters of the intra-uterus exposed to the drug, but had an effect on the survival of the pups and behavior in the open-field test.

Keywords: Primaquine. Development. Intrauterine. Open field

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Dinamica da primaquina <i>ex vivo</i>	31
Figura 2 -	Mortalidade	34
Figura 3 -	Ganho de peso	36
Figura 4 -	Levantar	40
Figura 5 -	Locomoção	41
Figura 6 -	Tempo no centro da arena	42
Figura 7 -	Limpeza	43
Figura 8 -	Bolo fecal	44
Figura 9 -	Retenção no centro	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Efeito da primaquina sobre a gestação	33
Tabela 2 -	Parâmetros do Desenvolvimento	35
Tabela 3 -	Parâmetros de Comportamento	37
Tabela 4 -	Campo Aberto (Macho)	38
Tabela 5 -	Campo Aberto (Fêmea)	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

G6PD	glicose-6-fosfato desidrogenase
PART	<i>presumptive antirelapse therapy</i>
Fe	Ferro
MET-HB	Met-hemoglobina
NADP-H	dinucleotídeo fosfato adenina nicotinamida
PQ	Primaquina
CYP	Citocromo P450
CECAL	Centro de Criação de Animais de Laboratório
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CLAE-DAD-UV	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de UV
ENSP	Escola Nacional de Saúde Pública
RPM	Rotações por minuto
PND	Dia pós natal

LISTA DE SÍMBOLOS

<	Menor que
>	Maior que
=	Igual a
%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
g	Unidade de aceleração (9,806 65 m/s ²)
p	Valor estatístico de "p"
μL	Microlitro
μg	Micrograma
mL	Mililitro
mg	Miligrama

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Primaquina	18
1.2	Justificativa	22
2	OBJETIVOS	23
2.1	Objetivo geral	23
2.2	Objetivos específicos	23
3	MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1	Procedimentos gerais	24
3.1.1	<i>Animais</i>	24
3.1.2	<i>Solução de primaquina</i>	24
3.1.3	<i>Cruzamento</i>	25
3.1.4	<i>Tratamento com primaquina</i>	25
3.1.5	<i>Quantificação de primaquina no plasma</i>	25
3.1.6	<i>Investigação da distribuição da primaquina entre o plasma e as hemácias</i>	25
3.1.7	<i>Investigação da passagem da primaquina para os filhotes via leite materno</i>	26
3.2	Investigação dos efeitos da exposição pré-natal à primaquina sobre o desenvolvimento pós-natal	26
3.2.1	<i>Tratamento com primaquina</i>	26
3.2.2	<i>Avaliação do desenvolvimento dos ratos expostos in útero à primaquina</i>	27
3.2.3	<i>Teste do campo aberto (open field)</i>	28
3.2.4	<i>Cronologia do início das observações de amadurecimento somático e dos testes de reflexos durante o desenvolvimento pós-natal</i>	29
3.2.5	<i>Análise estatística</i>	30
4	RESULTADOS	31
4.1	Distribuição da primaquina entre o plasma e as hemácias após contaminação in vitro	31
4.2	Avaliação da passagem da primaquina da mãe para os filhotes durante a	32

	amamentação.....	
4.3	Desenvolvimento e comportamento.....	32
4.3.1	<i>Toxicidade da primaquina sobre o nascimento.....</i>	32
4.3.2	<i>Mortalidade.....</i>	33
4.3.3	<i>Desenvolvimento.....</i>	34
4.3.4	<i>Comportamento.....</i>	36
5	DISCUSSÃO.....	46
6	CONCLUSÕES.....	47
	REFERÊNCIAS.....	48

1. INTRODUÇÃO

A malária é uma doença infecciosa potencialmente fatal causada por parasitas unicelulares (protozoários) transmitidos ao homem (hospedeiro secundário) por fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles* (hospedeiros definitivos). A malária humana é causada por 5 espécies de protozoários de gênero *Plasmodium*, o *P.vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, *P. falciparum* e *P. knowlesi*. Os parasitas *P. falciparum* e *P.vivax* são os mais comumente encontrados, sendo a forma mais grave e letal da doença causada por infecções com o *P. falciparum*¹. Entre os principais anofelinos transmissores da malária na América do Sul e no Brasil destacam-se o *An. darlingi*, o *An. marajoara*, o *An. deaneorum* e o *An. albitarsis*. Clinicamente a malária manifesta-se 8 a 25 dias após a infecção por febre, cefaleia, calafrios, dores nas articulações, anemia hemolítica, icterícia, hemoglobinúria, convulsões, sintomas que nos casos mais graves podem progredir para o coma e a morte. Tipicamente, a malária evolui por episódios febris cíclicos que tem início súbito com sensação de frio intenso, sucedida por calafrios, e febre culminando com sedação. Esses episódios ocorrem a cada dois dias nas infecções por *P.vivax* e *P. ovale*, a cada três dias nas infecções por *P. malariae* enquanto o *P.falciparum* (9 a 30 pós-infecção) causa febre recorrente a cada 36-48 h ou febre menos aguda e mais contínua².

Em 2013, foram registrados aproximadamente 198 milhões de casos de malária e cerca de 584 mil óbitos em decorrência da doença. A maioria dos casos da doença e das mortes ocorreu em países da África subsaariana; entretanto, regiões tropicais da Ásia, da América do Sul e, em menor escala, o Oriente Médio e o sul da Europa, também são afetadas. No Brasil os casos de malária se concentram na região Amazônica (Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins), áreas em que a doença é endêmica. Nas regiões onde a malária é endêmica, a doença contribui diretamente com cerca de 25 % de todas as mortes maternas³.

Crianças menores de cinco anos, mulheres grávidas e indivíduos com imunodepressão são os grupos da população mais susceptíveis às formas clínicas mais graves da malária⁴.

O agente etiológico da malária (*Plasmodium*) tem ciclo heteroxênico, e necessita de dois hospedeiros para completar o seu ciclo de vida, sendo o homem (ou outro vertebrado), o hospedeiro intermediário ou secundário, e o mosquito, o hospedeiro definitivo. A infecção do homem tem início com o repasto sanguíneo da fêmea do anofelino, que inocula na corrente sanguínea os esporozoítos (forma infectante) presentes na saliva do mosquito que, ao chegarem ao fígado, infectam os hepatócitos onde tem lugar ciclo pré-eritrocítico (ou

exoeritrocítica) de reprodução assexuada (esquizogonia tecidual). Na célula hepática o parasito perde as organelas do complexo apical e se torna arredondado adquirindo a forma de merozoíto. A multiplicação do parasito no interior das células hepáticas dá origem a um grande número de merozoítos que, liberados na corrente sanguínea, infectam as hemácias iniciando o ciclo eritrocítico de reprodução assexuada. No interior dos glóbulos vermelhos cada merozoíto dá origem de 8 a 24 novos merozoítos que são liberados com a ruptura das hemácias infectadas desencadeando o episódio febril e outros sintomas típicos da malária. Alguns merozoítos tornam-se gametócitos imaturos, que são células precursoras dos gametas femininos e masculinos do parasito. Os gametócitos são sugados junto com o sangue do hospedeiro secundário pela fêmea do mosquito *Anopheles* durante o repasto sanguíneo em indivíduos infectados com o parasito. No sistema digestivo do mosquito, os gametócitos amadurecem e se transformam em gametas masculinos e femininos que se fundem formando oocinetos ou zigotos que se transformam em esporozoítos. Os parasitos migram para as glândulas salivares do mosquito onde os esporozoítos presentes na saliva são inoculados no hospedeiro secundário durante um novo repasto sanguíneo, iniciando-se assim em outro indivíduo mais um ciclo de crescimento e multiplicação. Em contraste com o hospedeiro humano, aparentemente, o mosquito infectado não é afetado pela presença dos parasitas⁵.

No caso da fase exoeritrocítica (hepática) da infecção pelo *P.vivax*, alguns esporozoítos não se desenvolvem prontamente em merozoítos permanecem dormentes no interior da célula hepática por longos intervalos de tempo (de alguns meses – geralmente 7 a 10 meses – a vários anos) até serem reativados e se transformarem em merozoítos capazes de infectar hemácias. Essas formas adormecidas do parasito são conhecidas como hipnozoítos. Nesses casos, o desaparecimento dos sintomas e dos parasitos da corrente sanguínea não significa a cura definitiva (“cura radical”) da infecção malárica já que esta pode ressurgir sintomaticamente meses ou anos depois (recidivas).

As manifestações clínicas da malária ocorrem durante o ciclo eritrocítico do parasito, em função da grande destruição das hemácias e da liberação de restos celulares, toxinas e substâncias pirogênicas (que desencadeiam reações febris) na circulação sanguínea. Os sintomas iniciais da malária são mal-estar, cefaleia, vômito, cansaço e mialgia, que evoluem para o ataque paroxístico agudo, ou acesso malárico, caracterizado por febre alta, calafrio e intensa sudorese. Após a fase inicial, a febre assume caráter intermitente, e a periodicidade dos sintomas tem relação com a duração do ciclo eritrocítico de cada espécie de plasmódio: *P. falciparum*, 36 a 48h (terça maligna); *P. vivax*, 48h (terça benigna); *P. ovale*, 48h (terça

benigna); *P. malariae*, 72h (quartã benigna)⁶.

Durante a gravidez, a evolução clínica da malária é particularmente grave, podendo causar anemia acentuada, hipoglicemia, edema pulmonar, sepse puerperal, hemorragia, quadros neurológicos graves (malária cerebral) e evoluir para a morte materna. O desenvolvimento do conceito também é gravemente afetado, com taxas elevadas de perdas gestacionais (aborto espontâneo), morte intrauterina, prematuridade, nascimento de crianças com baixo peso para a idade gestacional, e morte neonatal⁷.

Em virtude do desenvolvimento de resistência do parasito a vários medicamentos antimaláricos, e de outros fatores, o tratamento farmacológico da malária é complexo e envolve via de regra a associação de mais de um composto ativo. Os esquemas terapêuticos são definidos de acordo com as características da infecção, ou seja, a espécie do plasmódio e a região geográfica onde a doença foi contraída, observando-se os dados atualizados sobre as cepas resistentes, a gravidade do quadro apresentado, e outras particularidades do paciente, como idade, comorbidades e, no caso de mulheres, se ela está grávida ou não. Se o antimalárico primaquina for uma das alternativas a ser cogitada, recomenda-se a realização de um teste para a deficiência genética da enzima G6PD (glicose-6-fosfato desidrogenase). O número de fármacos antimaláricos considerados seguros para o uso durante a gestação é limitado também pelos possíveis efeitos adversos para o conceito incluindo o potencial teratogênico, principalmente quando é necessário tratar a paciente durante o primeiro trimestre de gravidez⁸.

1.1 Primaquina

A primaquina é um composto 8-aminoquinolínico com atividade antimalárica, sintetizada pela primeira vez em 1946 nos Estados Unidos. Este medicamento apresenta propriedades terapêuticas singulares, que a distingue de todos os demais antimaláricos atualmente em uso. Os compostos antimaláricos do grupo dos 8-aminoquinolínicos agem sobre as formas em desenvolvimento e latentes (hipnozoítas) no interior das células hepáticas. Atua sobre os gametócitos maduros a primaquina reduz a transmissão e infectividade do *P. falciparum* nas áreas endêmicas⁹⁻¹⁰. Assim a primaquina é utilizada para promover a cura radical (*P.vivax*) e também é usada para profilaxia da infecção¹¹. A primaquina tem sido indicada para promover a cura radical da malária causada por *P. vivax* ou *P. ovale*, e até mesmo para tratar cepas multirresistentes de *P. falciparum*¹², sendo geralmente administrada em associação com fármacos que matam os esquizontes sanguíneos¹³. Além disso, é também um gametocida eficaz e também atua como esquizontecida tissular.

Como a primaquina é o único fármaco disponível para prevenir a recaída após infecção por *P. vivax* e *P. ovale* ela tem sido administrada como agente profilático do aparecimento da fase eritrocítica (sanguínea) em indivíduos que viajaram para áreas onde ocorre infecção por *P. vivax* ou *P. ovale*. Esta abordagem terapêutica é chamada presumível terapia profilática da recaída (“*presumptive antirelapse therapy*”, PART). Algumas autoridades sanitárias recomendam que a PART seja realizada em indivíduos com um certo risco de infecção por *P. vivax* ou *P. ovale*, apesar de não haver um consenso que defina o que seria um determinado risco¹⁴.

Em síntese, o uso da primaquina geralmente envolve um ou mais de três objetivos:

1. Profilático
2. Presumível terapia profilática da recaída (PART)
2. Cura radical

Contudo, o emprego clínico da primaquina como antimalárico é limitado por potenciais efeitos adversos de maior gravidade tais como a hemólise em indivíduos com deficiência genética da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6DP) e, conseqüente, a anemia hemolítica, e também a produção de meta-hemoglobinemia. A metahemoglobinemia, como o termo sugere, é o acúmulo de meta-hemoglobina no sangue. A metahemoglobina é formada quando o Fe⁺² (férico) da hemoglobina é oxidado a Fe⁺³ (ferroso), estado de oxidação em que o átomo de Fe do grupo prostético da proteína é incapaz de carrear o

oxigênio (O). Em indivíduos saudáveis mecanismos fisiológicos de redução mantêm a baixa taxa de metahemoglobinemia, que não excede de 1 a 2%. A primaquina desencadeia a formação de metahemoglobina particularmente em indivíduos com deficiência da enzima citocromo b5 redutase. A metahemoglobinemia reduz a capacidade de transporte de oxigênio das hemácias e, portanto, diminui a oxigenação dos tecidos.

O polimorfismo genético da enzima G6PD em populações humanas é bem conhecido, havendo diversas variantes do gene. A deficiência de G6PD torna o indivíduo susceptível às anemias hemolíticas

Nas hemácias, a G6PD catalisa a oxidação (perda de elétrons) da glicose-6-fosfato para dar origem ao 6-fosfoglutamato. Essa reação ocorre na presença de NADP (dinucleotídeo fosfato adenina nicotinamida) que recebe os elétrons e transforma-se em NADPH (forma reduzida). Como os indivíduos portadores de deficiência da G6PD podem apresentar uma menor produção de NADPH, há redução na atividade da NADPH meta-hemoglobina redutase e menor redução da meta-hemoglobina, cujos níveis tendem a aumentar.

Indivíduos com deficiência de G6PD são especialmente vulneráveis ao efeito hemolítico da primaquina. Há evidências clínicas e experimentais indicando que a primaquina atravessa a placenta ¹⁵. No caso das mães é possível diagnosticar se há mutações genéticas que resultam em deficiência de atividade da G6PD. Entretanto a investigação do fenótipo do concepto não é simples, envolvendo métodos invasivos e riscos. Portanto, não só a condição do concepto quanto à atividade de G6PD é desconhecida como ela é difícil de ser diagnosticada na prática clínica. Em virtude do risco de hemólise intravascular e suas complicações em indivíduos susceptíveis, o uso da primaquina tem sido contraindicado durante a gestação. Esta restrição de uso visa prevenir as graves consequências de um eventual desencadeamento de hemólise intravascular maciça quer no organismo materno, quer no fetal ¹⁶.

A farmacocinética da primaquina ainda não foi totalmente elucidada. Sabe-se que a primaquina é bem absorvida por via oral, liga-se em cerca de 20% a proteínas plasmáticas, distribui-se amplamente no organismo e é rapidamente metabolizada, com uma meia-vida de eliminação de aproximadamente seis h¹⁷ em seres humanos. O principal metabólito da primaquina no plasma, a carboxiprimaquina, é desprovido de atividade antimalárica. Entretanto, estudos relativamente recentes demonstraram de forma clara que a biotransformação da primaquina catalisada por CYP2D6 é essencial para a eficácia profilática e curativa (cura radical) da mesma no tratamento da malária. Ou seja, a CYP2D6 seria a

principal enzima que catalisaria a formação dos metabólitos hidroxilados¹⁷⁻¹⁸. Assim, enquanto uma parte da primaquina absorvida é convertida por ação de monoamino-oxidases (MAO) e CYPs em metabólitos inativos (e.g., carboxiprimaquina), outra parte é convertida no metabólito fenólico ativo por meio de oxidação mediada por CYP2D6¹⁸.

Em ratos *Wistar* a Primaquina é metabolizada pela CYP1A2, CYP3A4 e monoamino oxidases (MAO)¹⁹⁻²⁰. Estudos anteriores do nosso laboratório evidenciaram que a meia vida de eliminação da primaquina do plasma de ratos foi superior a 12 h ($\geq 12h$)²¹. Esse longa meia-vida de eliminação nos levou a formular a hipótese de que as hemácias poderiam acumular a primaquina em um compartimento intracelular de onde seria lentamente metabolizada e/ou liberada o que prolongaria a meia vida de eliminação. Um dos experimentos que realizamos teve o propósito de investigar e, se possível, responder a essa pergunta.

1.2 Desenvolvimento

Cerca de 2-4% dos recém-nascidos nascem com anomalias congênitas (OAKLEY, 1986). Essa incidência é independente do uso de drogas durante a gravidez, pois menos de 1% de anomalias congênitas são atribuídas à exposição de medicamentos prescritos na gestação (BECKMAN; BRENT, 1987). Destes 99% restantes, cerca de 9% é devido às condições da mãe, como diabetes, infecções ou drogas de abuso, e em torno de 20-25% pode ser genético e 65% de origem desconhecida (HANSEN; HARRIS, 2013). Atualmente, dentre as milhares de drogas terapêuticas disponíveis no mercado, apenas 20 fármacos ou grupos de droga são "universalmente reconhecidos como teratogênicos humanos" (SCHARDEIN, 2000). Destes, um total de onze estão incluídos em apenas dois grupos de drogas, os agentes anticancerígenos e anticonvulsivantes. Os eventos mais comuns em estudos teratológicos são morte embrião/feto (abortos), retardo do crescimento fetal (WEBESTER; FREEMAN, 2001). O aborto espontâneo 42 menciona a rescisão não intencional de uma gravidez antes da viabilidade fetal de 20 semanas de gestação ou quando o peso fetal for menor que 500 g. Isso ocorre em 8% a 20% das gestantes. (GUPTA et al., 2007). As anormalidades cromossômicas são a causa de cerca de 50% de todos os abortos. Com relação aos defeitos congênitos causas genéticas parecem ser responsáveis por 15-20% destes, fatores ambientais são reconhecidamente responsáveis por 7%, 20% são de etiologia multifatorial, porém nada, além disso, pode ser identificado e mais de 50% dos casos a causa permanece desconhecida (RAI; REGAN, 2006).

Um evento nos anos 60 marcou o cenário farmacêutico, mais de 10 mil crianças, no mundo, nasceram com graves defeitos congênitos, condigno ao uso da talidomida no início da gravidez (KOREN et al., 1989). A gravidade dos efeitos da talidomida e os órgãos afetados foram dependentes do dia exposição na gestação. Se a exposição à talidomida ocorresse nos dias 34-38 de gestação a prole nascia com polidactilia e anotia, enquanto a exposição nos dias 42-47 de gestação gerava uma focomelia dos membros inferiores (HANSEN; HARRIS, 2013). Estes resultados demonstram a importância dos estudos pré-clínicos de novos compostos. Porém existem centenas de milhares de fármacos com atividade biológica conhecida, e apenas 20 deles “são universalmente reconhecidos como teratogênicos humanos”, a natureza dessa razão parece irreal, visto a quantidade de etapas a serem superadas com sucesso em uma gravidez, é ingenuidade pensar que outros fármacos não seriam teratogênicos, e a forma acidental com que a atividade teratogênica dos compostos é descoberta é perturbadora. No entanto, a adequação dos testes e seus usos para prever se a droga é ou não teratogênico humano, ainda permanece controverso. Isso deve-se, principalmente as diferenças genéticas (SCHÜLER-FACCINI et al., 2001). Há numerosos exemplos de animais experimentais e vários casos suspeitos em seres humanos que demonstram existir diferenças genéticas na resposta a um teratogênico. Normalmente, os roedores são utilizados nestes estudos, entretanto, devido às diferenças genéticas entre as espécies, alguns estudos não foram bem sucedidos na identificação de teratogênicos humanos, como no caso da talidomida após ser retirada do mercado foram feitos testes em animais e não foi visto um efeito semelhante ao encontrado em humanos. Por exemplo, os corticóides, potentes teratogênicos em roedores, são considerados seguros para o homem, por outro lado, a talidomida, um teratogênico potente para o homem, é seguro para a maioria dos animais. Desta forma, a evidência definitiva de uma droga ser ou não teratogênica para os humanos só pode ser comprovada no próprio homem (SCHÜLER-FACCINI et al., 2001). Com relação aos medicamentos utilizados na gestação, as tetraciclina (antibiótico) que atravessam a barreira placentária e se depositam nos 44 ossos e nos dentes do embrião nos locais de calcificação ativa. Pode causar defeitos dos dentes, por exemplo, hipoplasia do esmalte e diminuição do crescimento dos ossos longos. (MOORE; PERSAUD, 2008). A penicilina tem sido amplamente utilizada durante a gravidez, parecendo não causar danos ao embrião e ao feto. O período de maior sensibilidade é entre 6 e 12 semanas após fertilização. Já drogas como a heparina não atravessam a barreira placentária, por isso é a droga preferencial para as mulheres grávidas que necessitam de tratamento com anticoagulantes (MOORE; PERSAUD,

2008).

1.4 Justificativa

Visto isso, é de grande importância a investigação do efeito de drogas durante a gestação, além disso a primaquina foi sintetizada em 1946 e entrou no mercado pouco tempo depois, devido a sua entrada antes dos eventos da talidomida, não eram feitos testes pré-clínicos da primaquina, portanto não se conhecem os efeitos teratogênicos ou os efeitos no desenvolvimento da prole, na clínica a primaquina não é utilizada devido a incerteza da condição enzimática do feto, e na literatura, os papers falham em demonstrar o motivo dessa recomendação, já que é apenas feita menção a droga e uma breve explicação do porque não deve ser utilizada. Esse trabalho se mostra relevante devido a lacuna de conhecimento que preenche, referindo-se aos possíveis efeitos adversos da exposição pré-natal à primaquina sobre o crescimento e desenvolvimento somático e neurocompartamental dos filhotes. Há pouquíssimos estudos dos efeitos da primaquina sobre o desenvolvimento pré-natal e, ao que sabemos, nenhum estudo anterior foi exitoso em mostrar o que realizamos e apresentamos nesse trabalho.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos da exposição pré-natal à primaquina sobre a sobrevivência, o crescimento e o desenvolvimento somático e neurocomportamental de ratos machos e fêmeas durante o período pós-natal até a puberdade.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Observar se o tratamento materno com primaquina durante a gravidez afeta o tamanho da ninhada, a mortalidade neonatal e viabilidade da prole exposta.
- Verificar se a exposição pré-natal à primaquina afeta o crescimento (ganho de peso) e a sobrevivência dos filhotes até a puberdade.
- Investigar se a exposição intra-útero à primaquina altera o desenvolvimento somático (marcos do amadurecimento somático) e neurocomportamental (maturação de reflexos) durante o período pós-natal.
- Determinar se a exposição pré-natal à primaquina afeta o desempenho do comportamento exploratório no teste do campo aberto (*open field*).
- Determinar após contaminação do sangue *in vitro* com primaquina a distribuição da mesma entre o plasma e as hemácias ao longo de duas h.
- Verificar se o tratamento das ratas nutrizas com primaquina durante o período de lactação resulta em contaminação dos filhotes que estão sendo amamentados (i.e. se há indicação de passagem via leite materno e absorção pelos filhotes).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Procedimentos gerais

3.1.1 Animais

Foram utilizados ratas (*Wistar*) com 70 a 90 dias de idade, provenientes do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Após serem recebidos no laboratório, os ratas foram mantidos em gaiolas de plástico de tamanho padrão para a espécie. As gaiolas tinham tampa de aço inoxidável e o fundo coberto por maravalha de pinho branco. Os animais foram alojados em grupos de no máximo 5 por gaiola, sendo mantidos no biotério de experimentação com temperatura (19 à 21°C), fotoperíodo (ciclos claro/escuro de doze hs, claro: 7-19 hs) e renovação de ar controlados. Água de torneira filtrada e ração comercial para ratos e camundongos (Nuvilab®) foram fornecidas *ad libitum* durante todo o experimento. Os animais foram fornecidos pelo CECAL após a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Instituição. Foram seguidas as diretrizes internacionais de segurança para uso de animais de laboratório.

3.1.2 Solução de primaquina

A solução usada para tratar os animais foi preparada a partir do difosfato de primaquina (cedido por Farmanguinhos/FIOCRUZ que adquiriu o produto da empresa Genix Ind, Farmacêutica Ltda). O fármaco foi dissolvido em água filtrada na concentração de 20 mg da primaquina base por 6 mL recebendo cada animal 6 ml da solução por kg de peso, foi a dose escolhida por ser a metade da dose não letal (Dose = 20mg da PQ base/kg de peso).

3.1.3 Cruzamento

O acasalamento foi realizado colocando duas fêmeas na gaiola de um macho por 2 h no final do período escuro. O dia em que a cópula foi confirmada pela presença de espermatozoides no esfregaço vaginal foi designado dia 0 da gravidez (GD 0).

3.1.4 Tratamento com Primaquina

A administração da solução de primaquina (PQ) foi feita por via oral (cânula intra-

gástrica). Com o animal contido manualmente pelo dorso, foi inserida uma agulha própria para gavagem de ratos, em aço inox curvo e com esfera metálica na extremidade distal, fixada à uma seringa de plástico. A administração da substância foi realizada lentamente. O controle recebeu água filtrada.

3.1.5 Quantificação de PQ no plasma

A concentração de PQ foi determinada em amostras de plasma de ratos pelo método desenvolvido e validado por Carmo (2015). O método consiste na extração da primaquina do plasma e subsequente análise por CLAE-DAD-UV. Todas as análises foram feitas no Laboratório de Toxicologia Ambiental – ENSP / FIOCRUZ, em equipamento *Shimadzu*® CLASS-VP.

3.1.6 Investigação da distribuição da primaquina entre o plasma e as hemácias

Para verificar em que medida a primaquina se distribui entre o plasma e as hemácias, uma amostra de sangue foi retirada de ratos Wistar por punção cardíaca. Antes da realização da punção cardíaca o animal foi colocado em uma câmara contendo CO₂ até a perda dos reflexos e observar-se que o mesmo não respondia mais a estímulos (estado anestésico). Sob efeito da anestesia e narcose causada pelo CO₂, a medula espinhal foi seccionada ao nível cervical, sendo então efetuada a punção cardíaca. O sangue de cada animal foi coletado em tubos tipo *ependorf* contendo heparina e mantidos à temperatura ambiente até a centrifugação. Para a separação do plasma, o sangue foi centrifugado a 8.000 RPM durante 3min em centrífuga *Minispin*® (*Eppendorf*). O plasma obtido foi aliquoteado em tubos tipo *ependorf*, enquanto a fração sólida (torta de hemácias) foi submetida a um choque térmico por rápida imersão em nitrogênio líquido, por três vezes, até o rompimento das membranas das hemácias e outras células. A quantificação da primaquina foi feita tanto no plasma quanto nas hemácias, seguindo a metodologia de Carmo (2015).

3.1.7 Investigação da passagem da primaquina para os filhotes via leite materno.

Duas ratas Wistar nutrizas foram separadas dos seus filhotes (lactentes) por 15 h no dia 19 de lactação. Após esse período de separação, as fêmeas nutrizas receberam por entubação gástrica a solução de primaquina (dose = 20 mg/kg). Durante a separação das mães, os filhotes foram mantidos em gaiolas com cama de maravalha abundante e temperatura

controlada. Em seguida ao tratamento das mães os filhotes foram devolvidos às respectivas mães sendo imediatamente amamentados por elas. Uma e quatro h após retornarem à gaiola da mãe, e terem sido por ela alimentados, os filhotes foram eutanasiados por decapitação, sendo o sangue então retirado para separação do plasma e posterior análise da concentração de primaquina por CLAE-DAD-UV.

3.2 Investigação dos Efeitos da Exposição Pré-natal à Primaquina sobre o Desenvolvimento Pós-natal.

3.2.1 Tratamento com Primaquina

Durante o período de tratamento diário com primaquina, a partir do dia zero (GD 0) e até a gravidez a termo, i.e., dia 21 de gestação, quarenta e seis ratas grávidas foram examinadas, sendo registrados os sinais clínicos de toxicidade e as alterações comportamentais. Para fins de comparação, os animais que receberam apenas água pura por entubação gástrica (grupo controle), foram avaliados da mesma forma que aqueles do grupo tratado com primaquina.

3.2.2 Avaliação do Desenvolvimento dos ratos expostos in útero à primaquina

Todos os parâmetros foram analisados segundo o método descrito em detalhes por Coelho²². A partir do GD 20, as gaiolas das ratas grávidas foram inspecionadas duas vezes ao dia para verificar se ocorreram partos espontâneos. No dia do nascimento (PND 1), os recém-nascidos foram examinados, contados os nascidos mortos e os nascidos vivos. Os neonatos foram examinados para identificação do sexo, pesados e marcados individualmente com injeção subcutânea de nanquim nas patas.

Para avaliar o aparecimento de marcos de maturação somática e aquisição de reflexos, as mães foram removidas e colocadas em uma outra gaiola de retenção, enquanto os filhotes foram examinados. Os filhotes com menos do que de 14 dias de vida foram mantidos em ambiente aquecido, sob a luz de uma lâmpada incandescente, pois ratos nascem sem controle pleno da temperatura corporal. Foram registrados os dias de aparecimento dos marcos de maturação somática descritos a seguir.

Erupção dos incisivos: primeiros sinais visíveis de erupção dos incisivos superiores e

inferiores através das gengivas.

Desenvolvimento da primeira penugem: aparecimento de um manto fino e uniforme de pelos. Dia em que este fino manto foi detectado pela primeira vez.

Desdobramento das orelhas: desprendimento total da ponta externa de ambas as orelhas.

Abertura dos olhos: separação total das pálpebras superior e inferior, e completa abertura dos dois olhos.

Abertura vaginal: descontinuidade da pele e aparência de uma abertura definida na área do canal vaginal.

Descida dos testículos: descida de ambos os testículos, confirmada pela cuidadosa apalpação escrotal.

Separação balano-prepucial: separação balano-prepucial foi investigada através de tentativas delicadas de retrain o prepúcio. O dia da separação prepucial foi aquele em que foi registrada a separação prepucial completa.

Uma série de reflexos neurológicos dos filhotes também foram testados como descrito a seguir.

Endireitamento postural: O filhote foi colocado em decúbito dorsal sobre uma superfície plana, sendo medido – com auxílio de um cronômetro - o tempo que ele leva para virar e ficar em decúbito ventral com todos os quatro pés no chão. O critério para considerar a resposta positiva (presença do reflexo) foi o filhote ter tido êxito em adquirir a posição prona em até 30 s.

Reflexo de preensão palmar: Cada pata dianteira foi suavemente tocada com um clipe de papel, sendo observado se ocorria a resposta de flexão dos dedos. O dia do desaparecimento da resposta de preensão (indicativo da maturação neural) foi registrado.

Esquiva ao abismo: O filhote foi colocado de frente para a borda de um “abismo” (borda de uma bancada) com o nariz e apenas as patas dianteiras sobre a borda. O tempo que

o filhote levou para virar e se afastar da borda da bancada (“abismo”) foi registrado. A resposta foi considerada positiva se este movimento de escape do “abismo” ocorreu em menos do que 10 s.

Reflexo de geotaxia negativa: O filhote foi colocado de frente com a cabeça para baixo em uma rampa de madeira com inclinação de 40°. O tempo que o filhote levou para girar 180° e colocar-se com a cabeça para cima da rampa (posição para subir a rampa) foi gravado. A resposta foi considerada positiva se este movimento de giro ocorreu em menos de 60 s.

Resposta de sobressalto acústico: O aparecimento da resposta de sobressalto acústico foi testado utilizando-se o som produzido pelo disparo da mola tensionada de uma ratoeira metálica posicionada pelo pesquisador atrás e a uma distância pré-fixada do filhote. A resposta física (sobressalto) do filhote ao som súbito do disparo da ratoeira foi o critério de positividade do teste. Uma resposta positiva foi indicada por uma resposta física ao estímulo.

Reflexo de endireitamento postural em queda livre: O filhote foi imobilizado manualmente e mantido alinhado com o solo e com a parte dorsal para baixo a uma altura de 30 cm da superfície macia (almofada de algodão) sendo solto é enquanto observada com atenção a queda. A resposta foi considerada positiva (aquisição do reflexo de endireitamento postural) quando, durante a queda, o animal virar-se no ar e pousa com as quatro patas tocando a almofada. O critério para a aquisição do reflexo foi o registro de duas quedas perfeitas (pouso com as quatro patas) em três tentativas consecutivas em dias consecutivos.

3.2.3 Teste do Campo Aberto (*Open Field*)

Os animais foram submetidos ao teste do campo aberto (para avaliar a atividade motora e o comportamento exploratório) quando completaram 25 dias de vida pós-natal. O aparelho de campo aberto utilizado foi uma arena circular feita de madeira com um diâmetro de 80 cm e paredes lisas com 30 cm de altura. O piso da arena foi dividido em áreas marcadas no chão como se segue: um círculo central (30 cm de diâmetro) com dois outros círculos concêntricos divididos por 6 raios. O aparelho foi localizado em uma sala silenciosa e iluminado por 3 lâmpadas posicionadas centralmente (60 W cada) suspensas a 150 cm acima do chão. Cada animal foi colocado individualmente no centro da arena e avaliado por um

período de 6 min divididos, para fins de registro dos parâmetros, em 3 períodos iguais de 2 min. Após cada teste, a arena foi limpa com solução de etanol (70%) e seca antes iniciar o teste seguinte com outro rato. Esse procedimento é fundamental para eliminar odores e pistas deixadas pelo animal testado e impedir que influenciem o comportamento do próximo rato. Contadores manuais e cronômetros foram usados para registrar a frequência de locomoção (número de quadrantes cruzados no piso da arena) e a frequência de episódios de levantar (“*rearing up*” ou número de vezes em que o animal fica em posição ereta apoiado nas patas traseiras), limpeza (“*grooming*” ou comportamento e movimentos de auto-limpeza). Os observadores desconhecem os grupos tratados¹⁴. A latência para deixar o quadrante central da arena no início do teste, e o número de bolos fecais deixados na arena foram também registrados¹⁵.

3.2.4 Cronologia do início das observações de amadurecimento somático e dos testes de reflexos durante o desenvolvimento pós-natal.

A idade (dia de vida pós-natal, PND) em que os filhotes começaram a ser examinados para o aparecimento do marco somático e aparecimento ou desaparecimento do reflexo testado. Após esse dia os animais foram examinados e ou testados até a resposta ser positiva. Os dias em que começaram as observações (marcos somáticos) ou testes (reflexos) de cada parâmetro foram os seguintes:

PND 1: Descolamento da orelha, endireitamento postural e reflexo de preensão.

PND 2: Desenvolvimento de primeira penugem, esquivas ao abismo e geotaxia negativa.

PND 6: Erupção dos incisivos.

PND 10: Resposta de sobressalto ao estímulo acústico.

PND 12: Abertura de olhos, reflexo de endireitamento postural em queda livre.

PND 14: Descida dos testículos

PND 25: Abertura vaginal e teste do campo aberto.

PND 30: Separação balano-prepucial

3.2.5 Análise estatística

As variáveis intervalares que apresentam distribuição normal (como por exemplo os pesos corporais) foram comparados por testes estatísticos paramétricos enquanto proporções, variáveis ordinais e variáveis intervalares em que se sabe ou suspeita-se que a distribuição não é normal, foram comparadas por testes não paramétricos. O teste paramétrico empregado para comparar duas médias foi o teste U de Mann-Whitney para amostras independentes. O teste não paramétrico (amostras independentes) empregado para comparar dois grupos foi o teste U de Mann-Whitney. Em todos os casos, o nível de significância estatística considerado para rejeitar a hipótese de nulidade foi de $\alpha = 5\%$ ($p < 0,05$) e as hipóteses e testes foram bidirecionais (bicaudais). Os cálculos estatísticos foram realizados por meio do programa *Graph Pad Prism* 6.0. Em todas os casos em que não é indicado o contrário, a ninhada (unidade de tratamento), e não o filhote individual, foi a unidade estatística utilizada nas análises.

4. RESULTADOS

4.1 Distribuição da primaquina entre o plasma e as hemácias após contaminação *in vitro*.

Para avaliar a distribuição da primaquina entre o plasma e o interior das hemácias, um volume de sangue de ratos foi retirado e contaminado externamente com uma quantidade conhecida de primaquina. O frasco contendo o sangue contaminado foi mantido em banho maria (a 37 °C) durante três h (180 min). Amostras do sangue contaminado foram retiradas aos 30, 45, 60, 90, 120 e 180 min e a concentração de primaquina foi determinada no plasma e na fração (torta) correspondente as hemácias. A Figura 1 mostra as concentrações de primaquina no plasma e nas hemácias ao longo dos 180 min de incubação *in vitro*.

Como pode ser visto no gráfico (Figura 1), a concentração de primaquina no plasma (30 min após a contaminação) é maior do que nas hemácias. Entretanto, com o passar do tempo, as concentrações de primaquina aumentam nas hemácias e diminuem no plasma até 120 min após o início da incubação *in vitro*, mas aos 180 min (última determinação) voltam a cair nos glóbulos vermelhos e a aumentar no plasma.

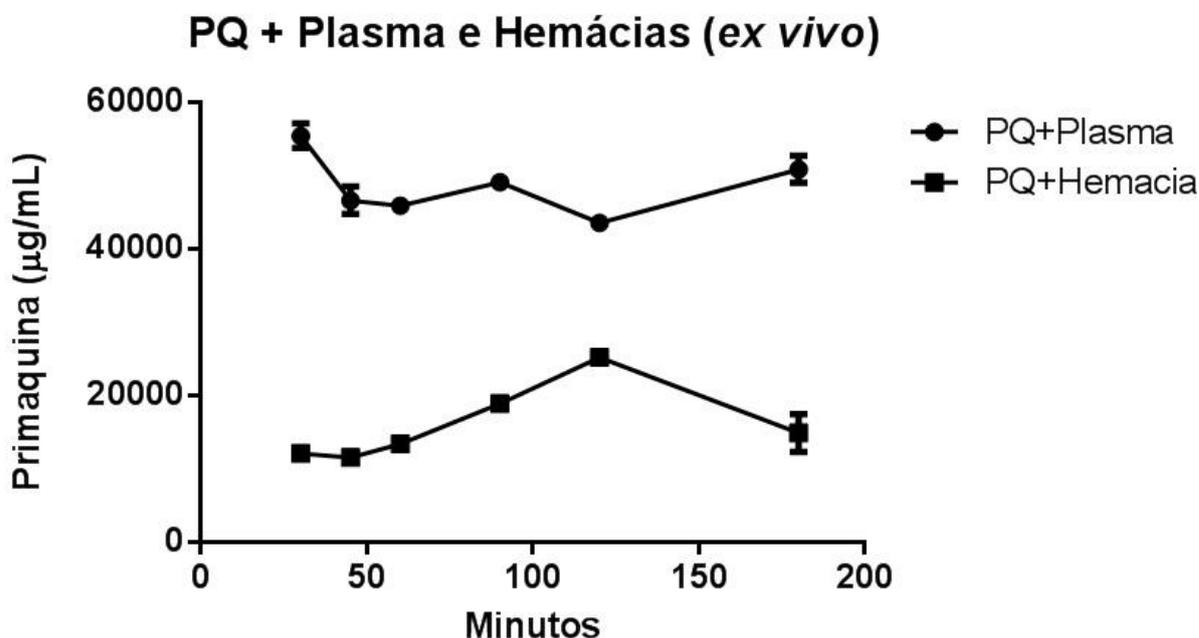


Figura 1: Distribuição da primaquina entre o plasma e as hemácias ao longo de 180 min após a contaminação do sangue de ratos *in vitro*. As amostras foram retiradas para análise dos níveis de primaquina aos 30, 45, 60, 90, 120, 180 min após a contaminação do sangue com primaquina (100µL da solução de 20mg/mL) no sangue (500µL) retirado de ratas *Wistar*.

4.2 Avaliação da passagem da primaquina da mãe para os filhotes durante a amamentação.

A análise do plasma sanguíneo coletado 1 e 4 h após os filhotes terem mamado o leite de nutrizas tratadas (tempo 0) com uma única dose de primaquina (20 mg/kg de peso *po*) não detectou primaquina (limite de detecção do método = 25 ng.mL⁻¹). Esse resultado negativo sugere fortemente que a contaminação dos filhotes de mães tratadas através do leite materno é inexpressiva, não ocorrendo em quantidades relevantes.

4.3 Desenvolvimento e Comportamento

4.3.1 Toxicidade da primaquina sobre o nascimento

O impacto na gestação causado pela primaquina pode ser visto na Tabela 1.

A primaquina provocou uma quantidade de reabsorções muito grande nas fêmeas tratadas, além de causar três episódios de abortamento completo da gestação, onde o útero das fêmeas possuía pontos de implantação mas as fêmeas não tiveram nenhum filhote.

Tabela 1: Efeitos do tratamento materno com primaquina (20 mg/kg peso/dia, po) durante a gravidez (GD 0-21) sobre desfechos da gestação avaliados ao nascimento e após o desmame (número de sítios de implantação). O sítio de implantação e o peso corporal dos filhotes no PND1 é expresso como média \pm DP. Os demais itens da tabela são números absolutos (N) e/ou razões.

Efeito da primaquina sobre o desfecho da gestação		
Parâmetros	Controle	Primaquina(PQ)
Ratas que acasalaram (N)	16	20
Ratas com sítios de implantação (N)	11	15
Sítios de implantação (N)	9,70(\pm 2,61)	11,71(\pm 6,09)
Total de filhotes (1 PN)	94	97
Natimortos (N)	0	2 [#]
Tamanho da ninhada	9 (5-14)	9(5-14)
Razão sexual (F/M)	0,98(\pm 0,18)	1,17(\pm 0,15)
Número de implantações	97	164
Ratas com perda total da ninhada na gravidez (N)	0	3
Peso corporal (PND 1) (g)	6,48(\pm 0,247)	6,16(\pm 0,441)

[#] Dois filhotes da mesma ninhada. Natimortos, encontrados mortos em <24 h após o parto.

4.3.2 Mortalidade

O efeito da primaquina sobre a sobrevivência dos animais é mostrado na Figura 3. Como pode ser visto na Figura 3, a primaquina provavelmente comprometeu o desenvolvimento intrauterino dos filhotes, além disso dois animais do grupo tratado nasceram mortos, ambos da mesma mãe, estes não estão na Figura 3.

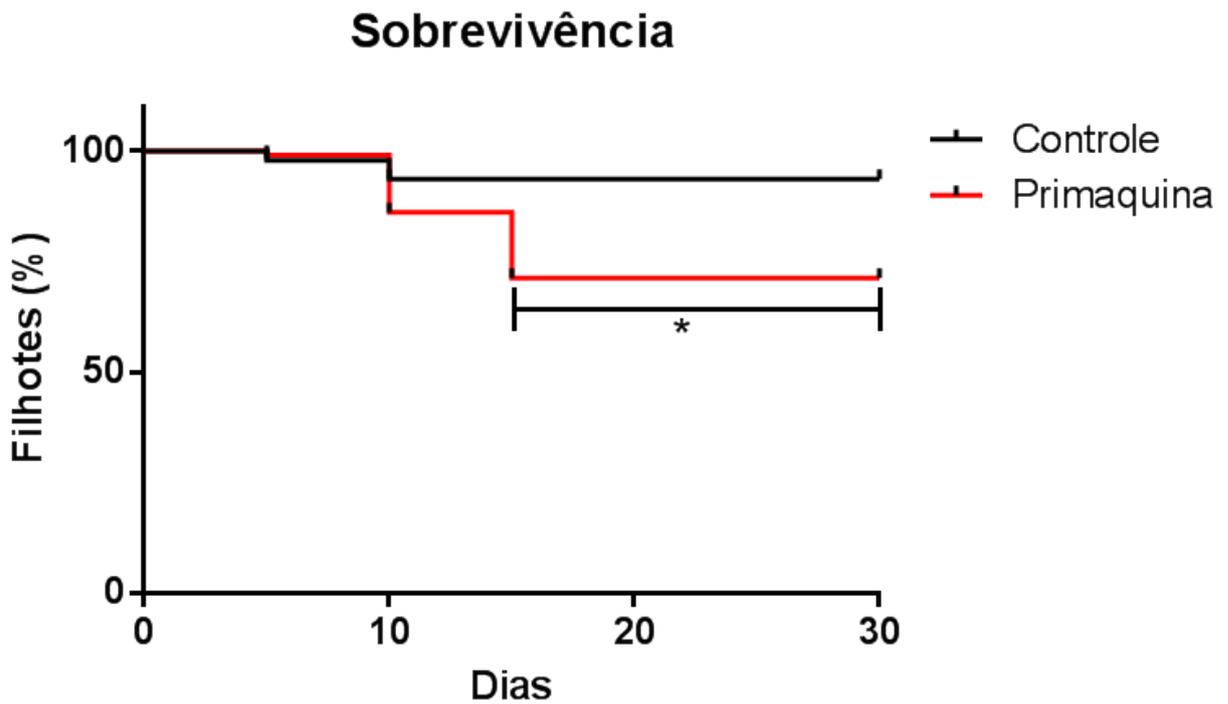


Figura 2: Eventos de morte dentro das ninhadas x dias (filhotes de ratas *Wistar* tratadas com primaquina durante a gestação). Os dados foram analisados pelo teste U de Mann-Whitney.

4.3.3 Desenvolvimento

A Figura 3 mostra o ganho de peso durante o crescimento dos filhotes no dois grupos, a diferença não foi estatística.

Como pode ser constatado na Tabela 2, a análise estatística indicou que o tratamento materno com primaquina não alterou os dias de aquisição de marcos do desenvolvimento somático e neurocomportamental da prole exposta.

Tabela 2: Efeito do tratamento materno com primaquina (20 mg/kg/dia) por via oral (entubação gástrica), durante a gravidez (dias 0-21 de gestação) sobre o aparecimento de marcos somáticos do desenvolvimento pós-natal da prole. Os dados são os dias do aparecimento (mediana e valores mínimo e máximo) dos marcos do desenvolvimento físico no período pós-natal. Os dados são apresentados por mediana (mínimo e máximo) das medianas registradas para cada ninhada avaliada no grupo.

Desenvolvimento Somático			
(Dia de vida pós-natal em que apareceu o marco de desenvolvimento)			
Marco Somático	Controle	Primaquina	P
Descolamento das orelhas	3(2-4)	3(2-5)	>0,05
Surgimento da primeira penugem	8(6-8)	7(6-9)	>0,05
Erupção dos incisivos	12(10-14)	11(9-13)	>0,05
Abertura dos olhos	15(14-17)	15(14-19)	>0,05
Descida dos testículos	17(15-19)	18(15-20)	>0,05
Abertura vaginal	36(27-42)	35(29-41)	>0,05
Separação prepucial	37(31-41)	35(33-40)	>0,05
Ninhadas (N)	11	12	-

As medianas foram comparadas pelo teste U de Mann-Whitney. A análise não revelou diferenças ($p>0,05$).

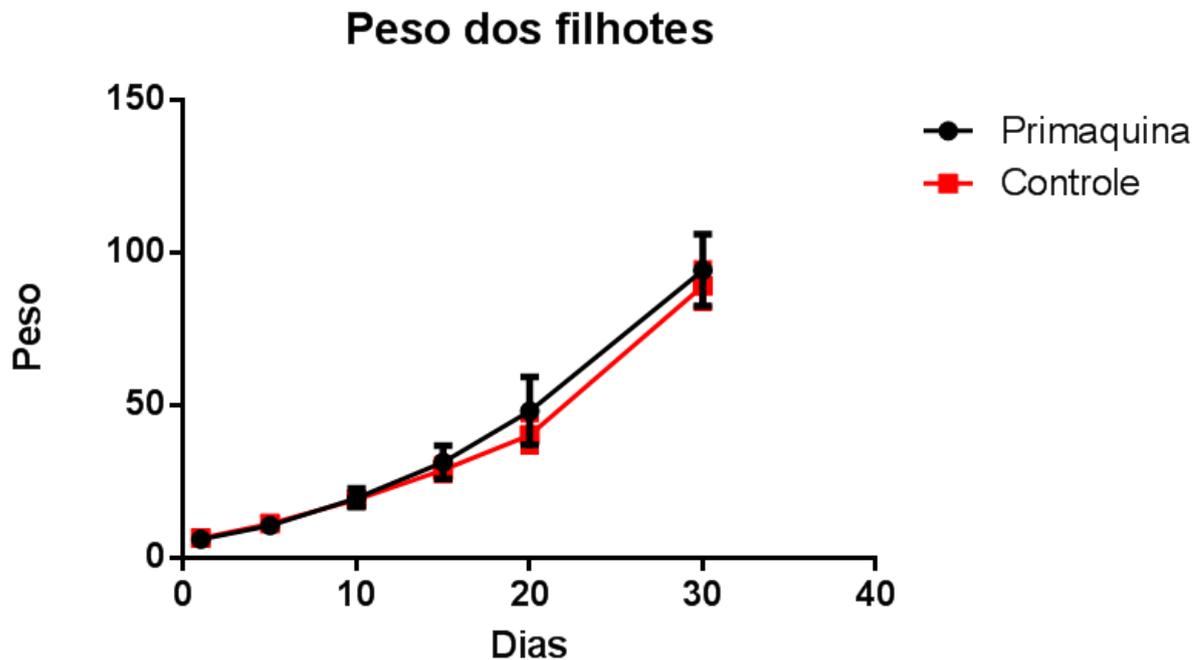


Figura 3: Ganho de peso dos filhotes (filhotes vivos até o dia 30 de ratas *Wistar* tratadas com primaquina durante a gestação). Os dados foram analisados pelo teste U de Mann-Whitney.

4.3.4 Comportamento

Os marcos do desenvolvimento neurocomportamental dos filhotes é mostrado na Tabela 3.

Como pode ser constatado na Tabela 3, a análise estatística indicou que o tratamento materno com primaquina não alterou os dias de aquisição de marcos do desenvolvimento somático e neurocomportamental da prole exposta

O desenvolvimento neurocomportamental da prole exposta a primaquina foi avaliado também pelo desempenho no teste do campo aberto. Na Tabela 4 são apresentados os resultados obtidos no teste campo aberto realizado com os filhotes machos com 25 dias de vida (25 PN). Os resultados relativos ao teste do campo aberto realizado na mesma época com as fêmeas são mostrados na Tabela 5. Tanto no caso da prole masculina, como da feminina, a análise estatística detectou diferenças entre os grupos tratados com primaquina e aquele que recebeu apenas o água filtrada (grupo controle). Estas diferenças estão expostas nas Tabelas 4 e 5, e também nas respectivas Figuras 4, 5, 7 e 8.

Tabela 3: Efeito do tratamento materno com primaquina (20 mg/kg peso/dia, po) durante a gravidez (GD 0-21) sobre o desenvolvimento neurocomportamental da prole. Os dados são apresentados por mediana (mínimo e máximo). Foram analisados pelo teste U de Mann-Whitney. Os dados são apresentados por mediana (mínimo e máximo) das medianas registradas para cada ninhada avaliada no grupo

Dia de vida pós-natal de aparecimento / desaparecimento do reflexo			
Reflexos	Controle	Primaquina(PQ)	P
Reflexo de endireitamento	2(1-6)	1(1-5)	p>0,05
Reflexo de preensão palmar[#]	7(5-10)	6(4-10)	p>0,05
Reflexo de esquiva ao abismo	6(1-11)	7(1-10)	p>0,05
Reflexo de geotaxia negativa	6(3-14)	7(4-15)	p>0,05
Reflexo de sobressalto acústico	13(12-14)	14(12-16)	p>0,05
Reflexo de endireitamento postural em queda livre	17(14-19)	17(14-20)	p>0,05
Ninhadas (N)	11	12	

[#] Dia de desaparecimento do reflexo de preensão palmar.

Tabela 4: Efeito do tratamento materno com primaquina durante a gravidez sobre o desenvolvimento neurocomportamental da prole masculina: Teste do campo aberto realizado no dia 25 de vida pós-natal (25 PN)

Campo Aberto			
Machos	Controle	Primaquina(PQ)	P
Levantar (N)	42,53(±18,16)	28,62(±12,09)	P>0,05
Locomoção (N)	133,25(±36,91)	104,54(±32,02)	P>0,05
Tempo no Centro (segundos)	8,73(±6,91)	6,07(±7,53)	P>0,05
Limpeza (N)	1,33(±1,03)	2,28(±0,83)	P <0,05
Bolos fecais (N)	4,11(±1,68)	4,38(±1,32)	P <0,05
Latência para sair do círculo central (segundos)	5,42(±6,72)	9,30(±5,51)	P>0,05
Ninhadas (N)	11	12	-

Tabela 5: Efeito do tratamento materno com primaquina durante a gravidez sobre o desenvolvimento neurocomportamental da prole feminina: Teste do campo aberto realizado no dia 25 de vida pós-natal (25 PN)

Campo Aberto			
Fêmeas:	Controle	Primaquina(PQ)	P
Levantar (N)	37,75(±21,16)	26,64(±16,43)	P<0,05
Locomoção (N)	122,69(±24,44)	96,76(±31,86)	P <0,05
Tempo no Centro (Segundos)	8,95(±8,36)	5,41(±6,32)	P>0,05
Limpeza (N)	1,5(±0,71)	2,09(±1)	P>0,05
Bolos fecais (N)	4,37(±1,80)	4,27(±2,26)	P>0,05
Latência para sair do círculo central (segundos)	5,36(±1,68)	8,11(±4,96)	P>0,05
Ninhadas (N)	11	12	-

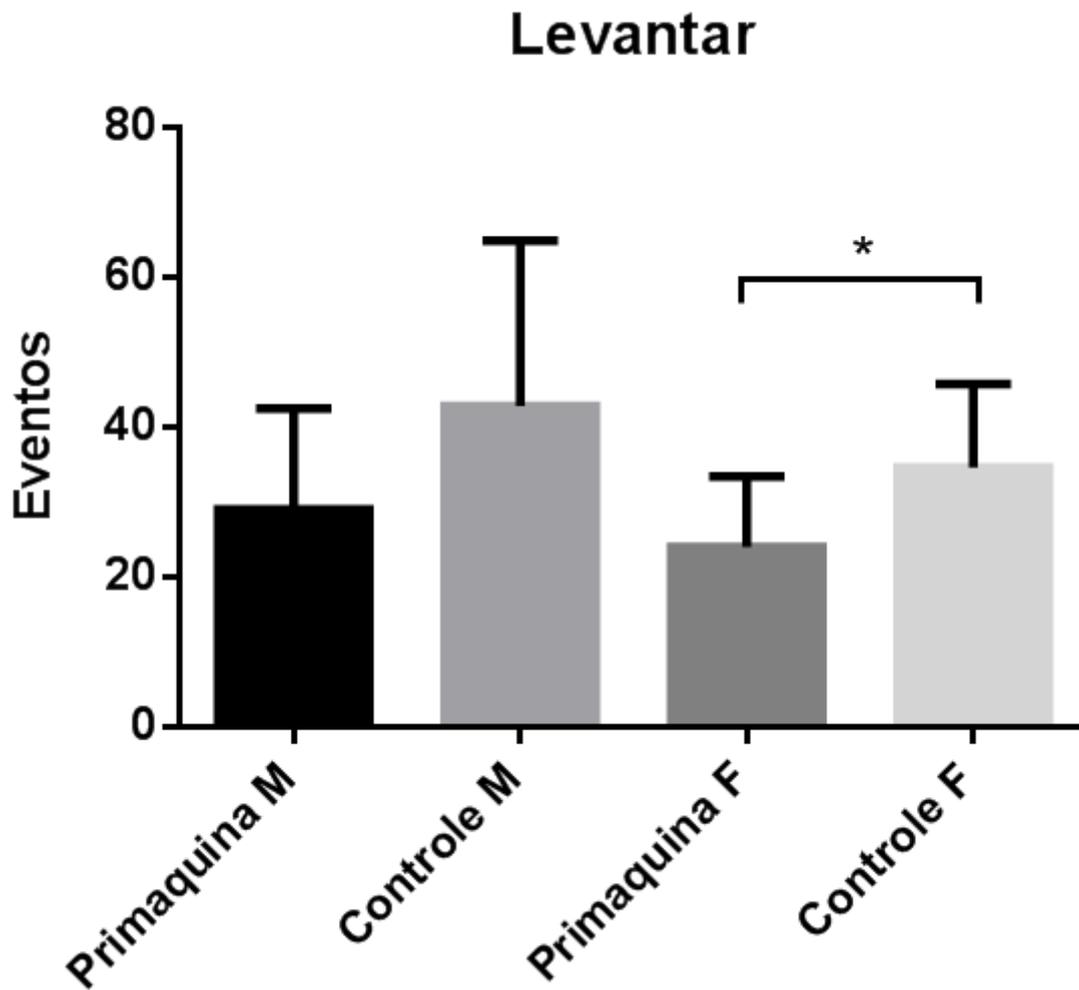


Figura 4: Número de episódios de “levantar” (“*rearing up*”) registrados na arena do campo aberto (tempo de teste = 6 min). Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (DP). Os grupos (médias das médias por ninhada) foram comparados pelo teste U de Mann-Whitney. O asterisco (*) indica que os grupos diferiram ($P < 0,05$).

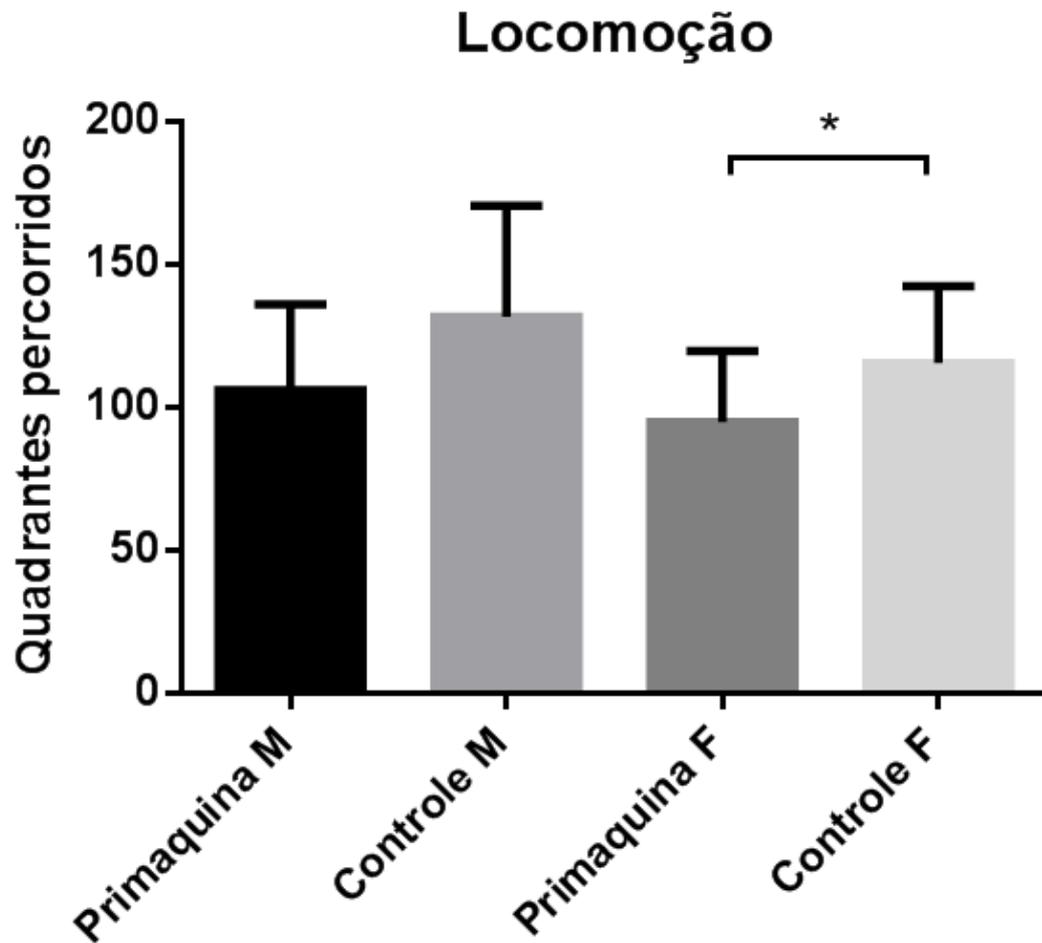


Figura 5: Número de quadrantes percorridos na arena do campo aberto durante o teste (duração do teste = 6 min). Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (DP). Os grupos (médias das médias por ninhada) foram comparados pelo teste U de Mann-Whitney. O asterisco (*) indica que os grupos diferiram ($P < 0,05$).

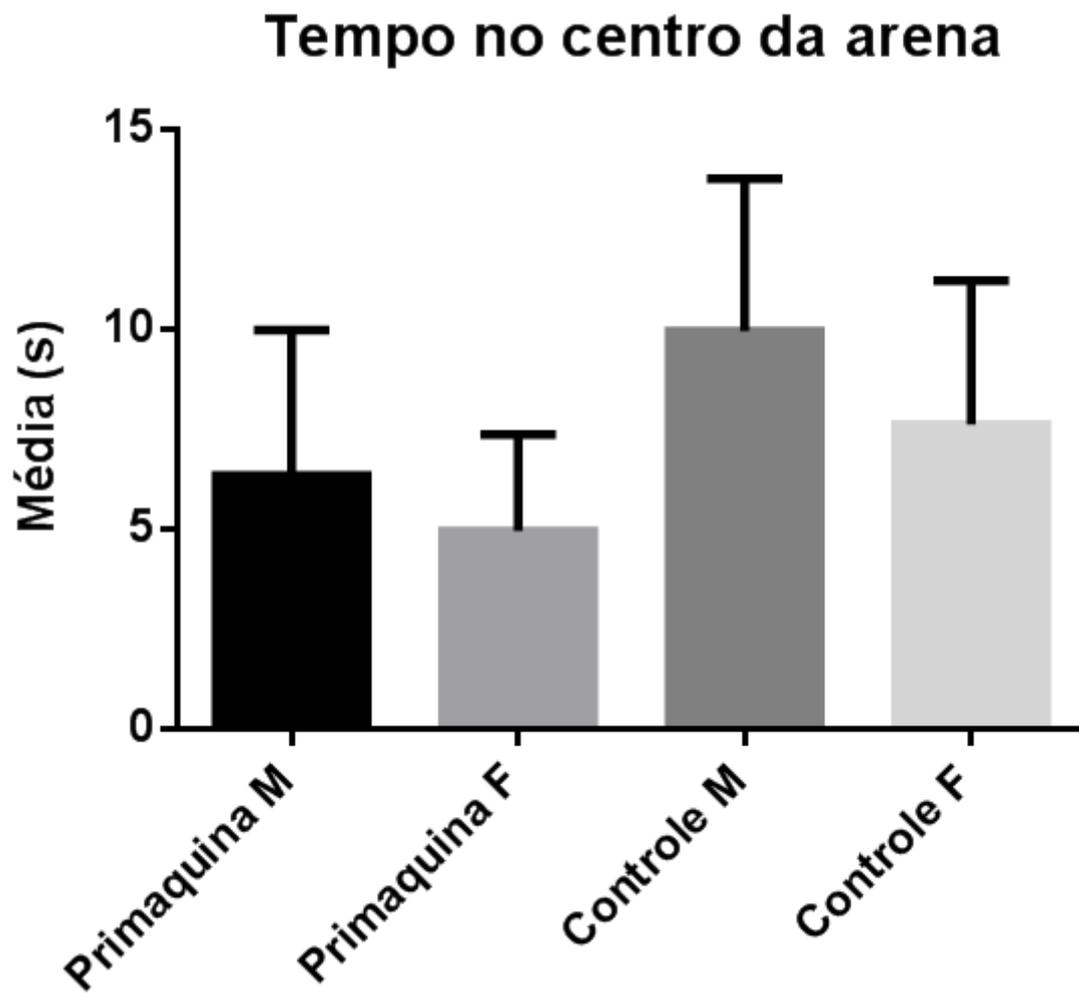


Figura 6: Tempo no centro da arena registrado. Os dados são apresentados por média e desvio padrão. Foram analisados pelo teste U de Mann-Whitney.

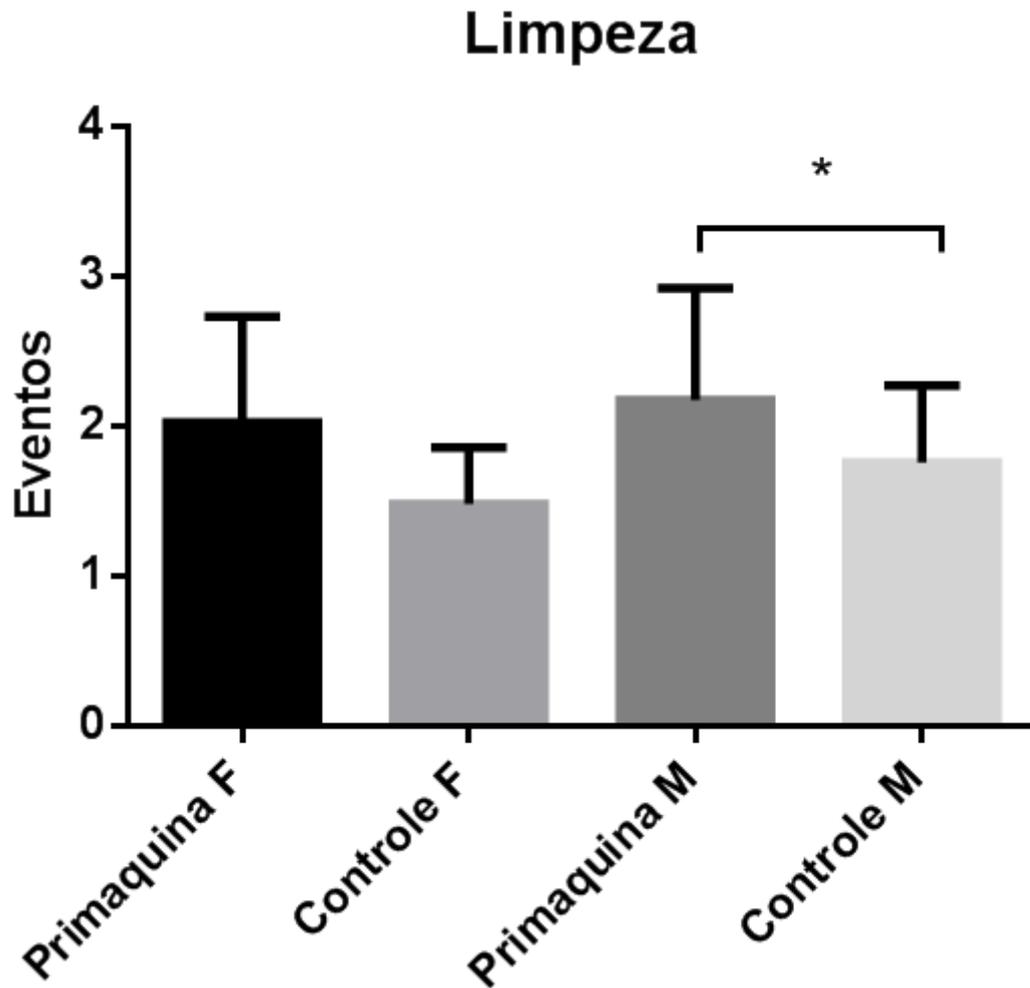


Figura 7: Número de episódios de comportamento de limpeza (“grooming”) durante o teste (6 min). Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (DP). Os grupos (médias das médias por ninhada) foram comparados pelo teste U de Mann-Whitney. O asterisco (*) indica que os grupos diferiram ($P < 0,05$).

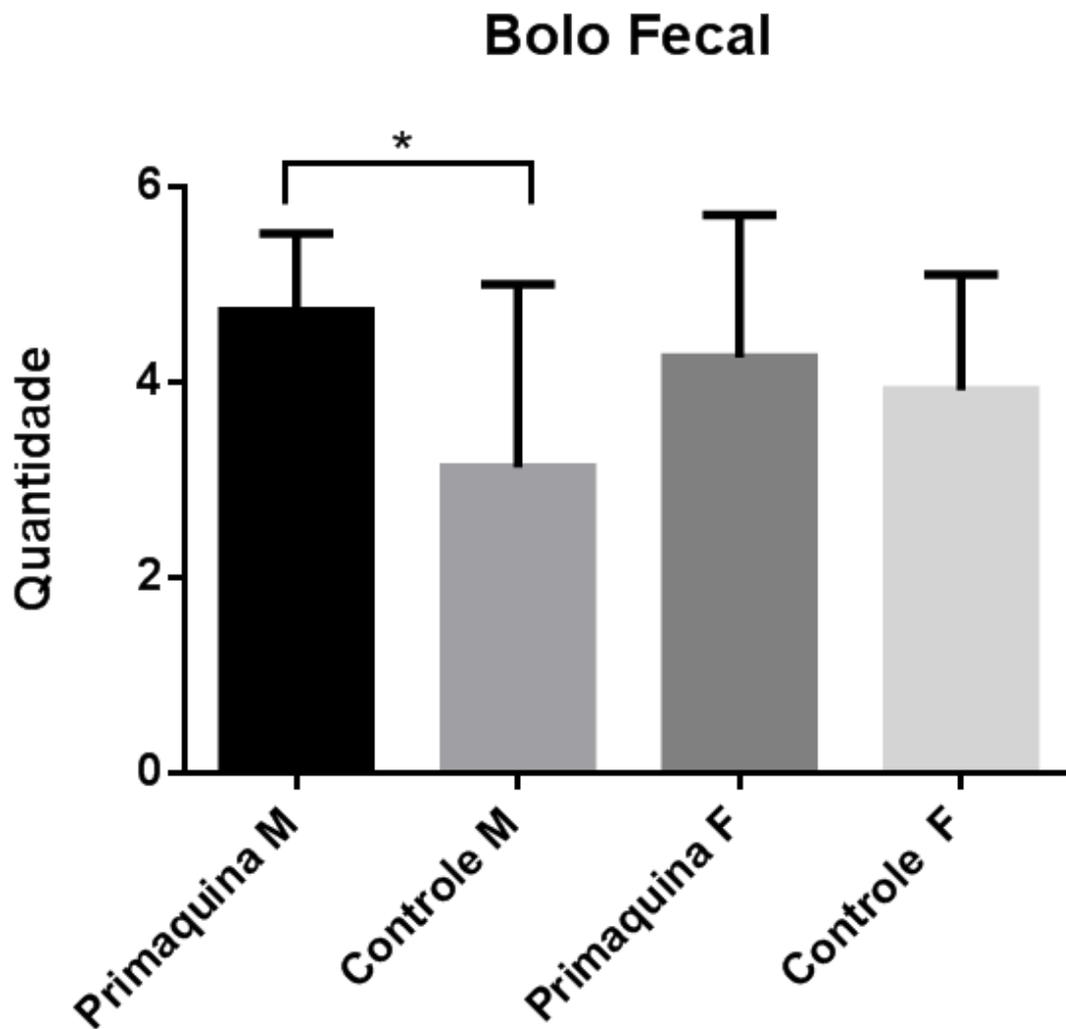


Figura 8: Número de bolos fecais deixados na arena de campo abeto após o teste (duração do teste = 6 min). Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (DP). Os grupos (médias das médias por ninhada) foram comparados pelo teste U de Mann-Whitney. O asterisco (*) indica que os grupos diferiram ($P < 0,05$).

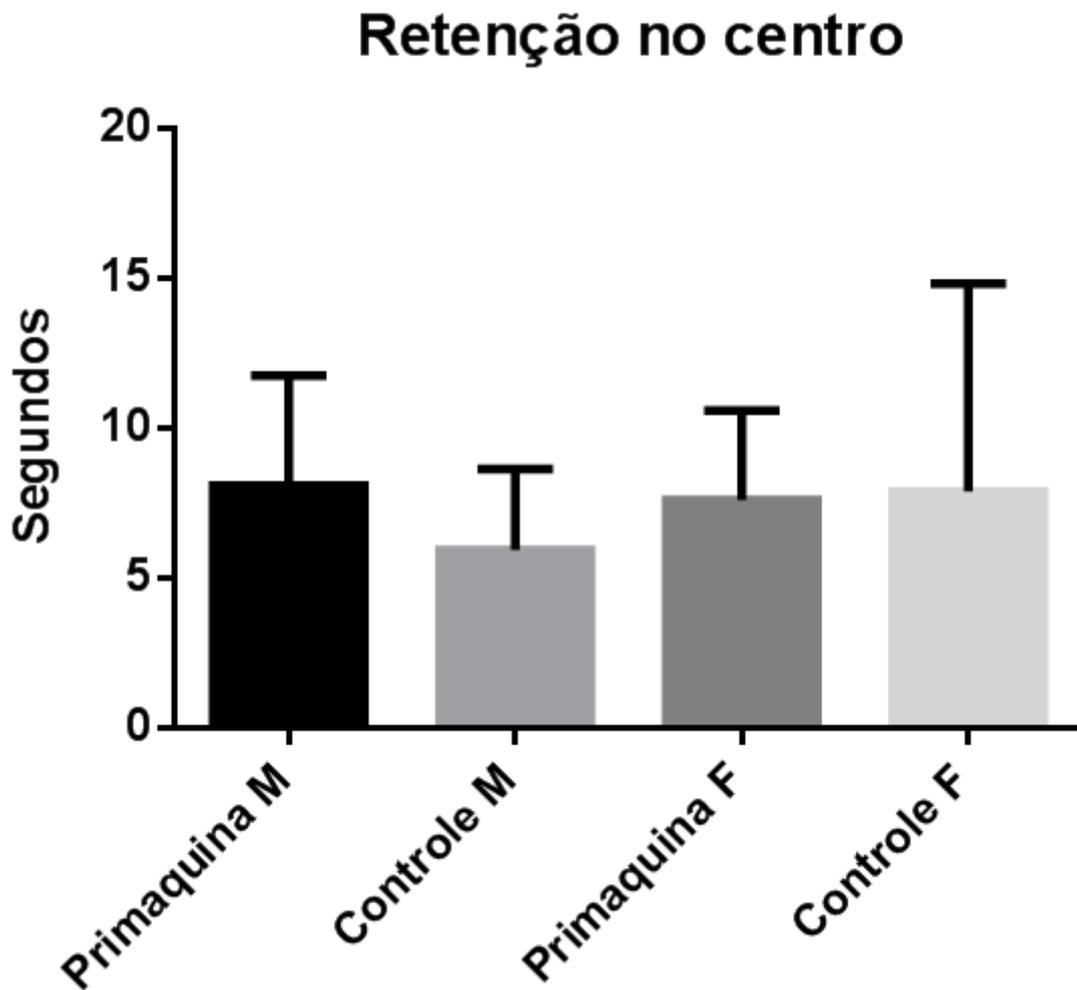


Figura 9: Latência (em segundos) para o rato deixar o círculo central no início do teste. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (DP). Os grupos (médias das médias por ninhada) foram comparados pelo teste U de Mann-Whitney. Os grupos não diferiram ($P > 0,05$).

5. DISCUSSÃO

A primaquina é o único fármaco disponível capaz de prevenir a recaída após infecção por *P. vivax* e *P. ovale*. A primaquina também é administrada como agente profilático de fase sangüínea em indivíduos que viajaram para uma área onde ocorre infecção por *P. vivax* ou *P. ovale*, a terapia é chamada profilaxia terminal ou *presumptive antirelapse therapy* (PART). Algumas autoridades sanitárias recomendam que PART seja realizado em indivíduos com determinado risco de infecção por *P. vivax* ou *P. ovale*, apesar de não haver um consenso que defina o determinado risco.

Atualmente a primaquina não é recomendada para o uso durante a gestação nem durante a amamentação devido à incerteza sobre a condição de G6PD do feto²⁵. Até o presente, não foi testado o potencial teratogênico ou seus problemas ao desenvolvimento dos indivíduos recém-nascidos e jovens. No presente trabalho foi visto que a primaquina foi pouco influente no desenvolvimento (erupção dos incisivos, desdobramento de orelhas, desenvolvimento de pelos, abertura dos olhos, abertura vaginal, descida dos testículos e separação prepucial) e comportamento (endireitamento postural, reflexo de preensão, esquiva ao abismo, geotaxia negativa, resposta sonora auditiva, reação postural de queda livre) dos neonatos. Não houve alterações em nenhum dos parâmetros durante o crescimento dos filhotes do grupo tratado, com exceção do campo aberto mostrando que entre os machos houve maior estresse visto o aumento significativo de pellets fecais e maior atividade devido ao aumento de self-grooming, e em fêmeas houve uma diminuição na ansiedade vista pelo aumento da exploração horizontal e vertical.

No entanto, a alteração foi expressiva em relação à sobrevivência dos filhotes e reabsorção dos fetos, conferindo uma toxicidade pouco manejável na dosagem de 20µg/kg, uma dose muito superior à dosagem utilizada em humanos, porém representa metade da maior dose não letal observada no nosso laboratório.

Durante o período de amamentação não foi observada passagem para o filhote através da amamentação, no entanto, o experimento precisa ser repetido com mais tempos e a primaquina ser dosada no próprio leite, pois mesmo que não seja absorvido pode haver toxicidade na luz intestinal da prole.

6 CONCLUSÕES

- O tratamento com primaquina durante a gravidez não interferiu no tamanho da ninhada, porém impactou na absorção de três ninhadas completas e interferiu na mortalidade neonatal e na viabilidade da prole exposta à primaquina.
- A exposição pré-natal dos animais a primaquina não afetou o crescimento (ganho de peso), no entanto a viabilidade dos filhotes até a puberdade foi significativamente menor do que o grupo controle.
- A exposição intra-útero à primaquina não alterou o desenvolvimento somático (marcos do amadurecimento somático) e neurocomportamental (maturação de reflexos) durante o período pós-natal.
- A exposição pré-natal à primaquina alterou o comportamento exploratório dos filhotes no teste do campo aberto (*open field*).
- O acúmulo de primaquina nas frações do sangue (*in vitro*) foi evidenciada na ascensão da curva no minuto 120 mostrando que a primaquina ganhou o interior das hemácias ao longo de duas h.

O tratamento das ratas nutrizas com primaquina durante o período de lactação não resultou em contaminação dos filhotes que estão sendo amamentados (i.e. se há indicação de passagem via leite materno e absorção pelos filhotes).

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. World malaria report 2014. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2014. Disponível em http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/report/en. Acessado em 8 de maio de 2017.
2. Ferri FF(2009). Chapter332. Protozoal infections. Ferri's Color Atlas and Text of Clinical Medicine. [S.I.]: Elsevier Health Sciences. p. 1159. ISBN 978-1-4160-4919-7.
3. Malaria fact Sheet nº94. World Health Organization Web site. <Http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/>. Atualizada em Abril de 2014. Acessado em 16 de março de 2017.
4. Schantz-Dunn J; Nour NM. Malaria and pregnancy: A global health perspective. *Reviews in Obstetrics & Gynecology* 2009;(2)5:186-192.
5. Center for Disease Control Web site. <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/>. Atualizada em Fevereiro de 2016. Acessada em 8 de maio de 2017.
6. França TCC, Santos MG, Figueroa-Villar JD. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. *Quim. Nova* 2008;(31)5:1271-1278.
7. Rogerson SJ, Duffy LHPE; Leke RFG; Taylor DW. Malaria in pregnancy: pathogenesis and immunity. *The Lancet Infectious Diseases* 2007 Feb;(7)2:105-117, ISSN 1473-3099.
8. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia prático de tratamento da malária no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde; 2010
9. Rieckmann KH, mcnamara JV, Kass L, Powell RD. Gametocytocidal and sporontocidal effects of primaquine upon two strains of *Plasmodium falciparum*. *Military medicine*. 1969;134(10):802-19.
10. Rieckmann KH, mcnamara JV, Frischer H, Stockert TA, Carson PE, Powell RD. Gametocytocidal and sporontocidal effects of primaquine and of sulfadiazine with pyrimethamine in a chloroquine-resistant strain of *Plasmodium falciparum*. *Bulletin of the World Health Organization*. 1968;38(4):625-32
11. Vale N, Moreira R, Gomes P. Primaquine revisited six decades after its discovery. *Eur J Med Chem*. 2009;44:937–953.
12. Hill DR, Baird JK, Parise ME, Lewis LS, Ryan ET, Magill AJ. Primaquine: report from CDC expert meeting on malaria chemoprophylaxis I. *Am J Trop Med Hyg*. 2006;75:402–415.
13. Vale N, Moreira R, Gomes P. Primaquine revisited six decades after its discovery. *European journal of medicinal chemistry*. 2009;44(3):937-53
14. David r. Hill,* j. Kevin baird, monica e. Parise, linda s. Lewis, edward t. Ryan, and alan j. Magill .primaquine: report from CDC expert meeting on malaria chemoprophylaxis i. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 75(3), 2006, pp. 402–415
15. Edwards G. Antimalarial chemotherapy: Mechanisms of action, resistance and new directions in drug discovery. *British Journal of Clinical Pharmacology* 2001;52(4):464.
16. Nosten F, mcgreedy R, d'Alessandro U, Bonell A, Verhoeff F, Menendez C, Mutabingwa T, Brabin B. Antimalarial drugs in pregnancy: a review. *Curr Drug Saf*. 2006 Jan;1(1):1-15.
17. White NJ. Antimalarial pharmacokinetics and treatment regimens. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 1992;34(1):1-10.

18. Pybus BS, Sousa JC, Jin X, Ferguson JA, Christian RE, Barnhart R, et al. CYP450 phenotyping and accurate mass identification of metabolites of the 8-aminoquinoline, anti-malarial drug primaquine. *Malar J.* 2012;11:259.
19. Pybus BS, Marcsisin SR, Jin X, Deye G, Sousa JC, Li Q, et al. The metabolism of primaquine to its active metabolite is dependent on CYP 2D6. *Malar J.* 2013;12:212.
20. Li XQ, Bjorkman A, Andersson TB, Gustafsson LL, Masimirembwa CM. Identification of human cytochrome P(450)s that metabolise anti-parasitic drugs and predictions of in vivo drug hepatic clearance from in vitro data. *European journal of clinical pharmacology.* 2003;59(5-6):429-42.
21. Constantino L, Paixao P, Moreira R, Portela MJ, Do Rosario VE, Iley J. Metabolism of primaquine by liver homogenate fractions. Evidence for monoamine oxidase and cytochrome P450 involvement in the oxidative deamination of primaquine to carboxyprimaquine. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie.* 1999;51(4-5):299-303.
22. Rosa L. Estudo da cinética do fármaco antimalárico primaquina em ratas grávidas e não grávidas. Rio de Janeiro. Dissertação [Mestrado em Saúde Pública] – ENSP Fiocruz; 2016.
23. Coelho, Deise Riba. Desenvolvimento somático, neurocomportamental e fertilidade da pôle de ratos exposta ao antimoniato de meglumina pela via transplacentária e leite materno' 01/06/2010 85 f. Mestrado em saúde pública Instituição de Ensino: Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro Biblioteca Depositária: Lincoln de Freitas Filho
24. De Castro PC¹, Hoshino A, da Silva JC, Mendes FR. Possible anxiolytic effect of two extracts of *Passiflora quadrangularis* L. In experimental models. *Phytother Res.* 2007 May;21(5):481-4.
25. Brusque AM¹, Mello CF, Buchanan DN, Terracciano ST, Rocha MP, Vargas CR, Wannmacher CM, Wajner M. Effect of chemically induced propionic acidemia on neurobehavioral development of rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1999 Nov;64(3):529-34.
26. Marie-Hélène Irvine, Adrienne Einarson, Pina Bozzo. Prophylactic use of antimalarials during pregnancy. *Canadian Family Physician.* Vol 57: november 2011.