

# Efeitos do uso crônico do nelfinavir sobre a prenhez da rata albina: ensaio biológico

Effects of chronic nelfinavir treatment on rat pregnancy: biological assay

Camila Fernandes Venneri Mathias<sup>1</sup>, Cicero Venneri Mathias<sup>2</sup>, Ricardo Santos Simões<sup>3</sup>,  
Ricardo Martins Oliveira-Filho<sup>4</sup>, Abes Mahmed Amed<sup>5</sup>, Manuel de Jesus Simões<sup>6</sup>, Luiz Kulay Júnior<sup>7</sup>

## RESUMO

**Objetivo:** avaliar o efeito do uso crônico do nelfinavir sobre o peso de ratas albinas prenhes e seus conceptos, bem como o número de implantações, fetos, placentas, reabsorções e mortalidade materna e fetal. **Métodos:** 50 ratas albinas EPM-1 Wistar, prenhes, foram aleatoriamente divididas em cinco grupos: 2 controles, Contr1 (controle do estresse) e Contr2 (controle do veículo), e três experimentais, Exp40, Exp120 e Exp360, que receberam, respectivamente, 40, 120 e 360 mg/kg por dia de nelfinavir por via oral. A droga e o veículo (água destilada) foram administrados por gavagem em duas tomadas diárias (12/12 horas), desde o primeiro dia até o dia 20 da prenhez. No último dia do experimento, todos os animais foram anestesiados e sacrificados. Foram avaliados a evolução do peso, número de implantações, reabsorções, fetos, placentas, óbitos intra-uterinos, o peso dos fetos e das placentas e malformações maiores. A análise estatística foi realizada pela análise de variância (ANOVA) completada pelo teste de Kruskal-Wallis. **Resultados:** em relação ao ganho de peso das ratas, houve ganho normal em todos os grupos, não sendo constatadas diferenças significantes entre eles. ANOVA mostrou ausência de diferenças significantes entre os grupos quanto aos parâmetros estudados. As médias do número de fetos foram: controles =  $9,7 \pm 0,50$ ; grupos tratados com nelfinavir =  $9,7 \pm 0,81$ . Para as médias de números de placentas e implantações, controles =  $9,7 \pm 0,50$ ; grupos tratados com nelfinavir =  $9,7 \pm 0,78$ . Quanto às médias de pesos fetais, controles =  $4,04 \pm 0,50$ ; grupos tratados com nelfinavir =  $3,91 \pm 0,33$  g. Finalmente, para as médias de pesos de placentas, controles =  $0,64 \pm 0,02$ ; grupos tratados com nelfinavir =  $0,67 \pm 0,02$  g. Além disto, não foram observadas reabsorções, mortalidade das matrizes, óbitos e malformações fetais. **Conclusões:** o nelfinavir, em todas as doses administradas, não influenciou no ganho de peso das ratas prenhes e não mostrou efeitos deletérios sobre os conceptos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Nelfinavir/efeitos adversos; Placenta; AIDS; Anti-retrovirais; Transmissão vertical de doença

## ABSTRACT

**Purpose:** to evaluate the chronic effects of nelfinavir on body weight gain of pregnant albino rats and their concepts, as well as on the number of implantations, reabsorptions, fetuses, placentae, and maternal and fetal mortality. **Methods:** fifty pregnant EPM-1 Wistar albino rats were randomly divided into five groups: two controls, Contr1 (control of stress) and Contr2 (drug vehicle control), and 3 experimental groups, Exp40, Exp120, Exp360, which received 40, 120 or 360 mg/kg per day of oral solution of nelfinavir, respectively. The drug and the vehicle (distilled water) were administered twice a day (12/12 h) by gavage from the first up to the 20th day of pregnancy. After sacrifice under deep anesthesia, the following parameters were evaluated: number of implantations and reabsorptions, the weight of fetuses and placentae, and the number of intrauterine deaths as well as inspection for major malformations. Data were evaluated by ANOVA followed by the Kruskal-Wallis multiple comparison test. **Results:** body weight gain during pregnancy was normal for all the groups, and no significant differences were detected between them. ANOVA did not reveal any

Trabalho realizado no

1 Pós-Graduanda do Departamento de Obstetrícia - Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP - São Paulo (SP), Brasil.

2 Professor Assistente do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Fundação do ABC - Santo André (SP), Brasil.

3 Residente do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia - Universidade Federal de São Paulo - São Paulo (SP), Brasil.

4 Professor Doutor do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo - USP - São Paulo (SP), Brasil.

5 Prof. Adjunto do Departamento de Obstetrícia - Universidade Federal de São Paulo - São Paulo (SP), Brasil.

6 Prof. Adjunto do Departamento de Morfologia da Universidade Federal de São Paulo - São Paulo (SP), Brasil.

7 Prof. Titular do Departamento de Obstetrícia - Universidade Federal de São Paulo - São Paulo (SP), Brasil.

Correspondência: Camila Fernandes Venneri Mathias

Rua Dr. Esdras Pacheco Ferreira, 143 - Vila Nova Conceição - 04507-060 - São Paulo - SP

Recebido em: 17/1/2006

Aceito com modificações em: 20/2/2006

significant effect of nelfinavir on the studied parameters. The means of number of fetuses were: control =  $9.7 \pm 0.50$ ; nelfinavir-treated groups =  $9.7 \pm 0.81$ . Regarding the means of number of placentae and implantations, controls =  $9.7 \pm 0.50$ ; nelfinavir-treated groups =  $9.6 \pm 0.78$ . The mean fetal weights were as follows: controls =  $4.04 \pm 0.50$ ; nelfinavir-treated groups =  $3.91 \pm 0.33$  g. Finally, control placental weights averaged  $0.64 \pm 0.02$ ; nelfinavir-treated groups =  $0.67 \pm 0.02$  g. **Conclusion:** nelfinavir was well tolerated at all the administered doses; no damage was produced on the fetuses.

**KEYWORDS:** Nelfinavir/adverse effects; Placenta; AIDS; Antiretroviral drugs; Disease transmission, vertical

## Introdução

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

Recentemente o programa de combate a AIDS/HIV das Nações Unidas (UNAIDS) relatou que o mundo registrou 5 milhões de novas infecções, de 3 milhões de mortes e um total de 40 milhões de pessoas infectadas. As mulheres respondem por 50% de toda a população HIV positiva no mundo<sup>1</sup>.

O Ministério da Saúde, em 2005, revela que existem aproximadamente 600.000 portadores do HIV e mais de 12.000 grávidas contaminadas. A taxa de mulheres portadoras do vírus no momento do parto gira em torno de 0,5%<sup>2</sup>. A taxa de mortalidade por AIDS no Brasil encontra-se estabilizada desde 1999, com uma média de 6,3 mortes por 100.000 habitantes. Esse índice é fruto da distribuição gratuita de anti-retrovirais. O Brasil é citado como o primeiro país em desenvolvimento a oferecer a terapia anti-retroviral gratuita e universal e um dos primeiros a obter sucesso<sup>3</sup>.

Desde o estudo do *Pediatric AIDS Clinical Group*, conhecido como Protocolo 076 (ACTG 076), no qual se demonstrou redução da taxa de transmissão vertical em 70% com a administração de zidovudina (AZT) à gestante<sup>4</sup>, os benefícios da terapia anti-retroviral vêm sendo amplamente estudados em associação com outras intervenções, como cesárea eletiva e supressão de aleitamento materno, a fim de reduzir a taxa de transmissão vertical<sup>5</sup>. Embora inicialmente preconizada a monoterapia com AZT, há recomendações recentes de que as gestantes não devem ser privadas do uso de combinações de drogas potentes, visto que atualmente esses esquemas estão relacionados a menor taxa de transmissão vertical<sup>6</sup>.

O nelfinavir é anti-retroviral inibidor de protease aprovado em 1997 para o tratamento de indivíduos infectados pelo HIV-1 e HIV-2, sendo um dos mais prescritos em adultos, adolescentes e crianças com idade acima de dois anos, e pode ser usado nas gestações com menos de 28 semanas e com carga viral mais acentuada<sup>7</sup>. Interfere nos genes da replicação viral alterando a estrutura de poliproteínas Gag e Gag-pol que alteram a configuração do capsídeo, levando à formação de vírus imaturos e não infectantes<sup>8</sup>.

Poucos trabalhos foram encontrados na literatura sobre o uso de nelfinavir em ratas prenhes. Estudos sobre o potencial do mesilato de nelfinavir em induzir toxicidade embrio-fetal em ratas e coelhas prenhes que receberam o medicamento por via oral não encontraram alterações nos conceitos nas doses de 200, 500 e 1000 mg/kg por dia do 6º ao 17º dia da prenhez<sup>9,10</sup>. No entanto, outros autores, utilizando esse medicamento por gavagem na dose de 97,5 mg/dia desde o dia inicial ao 21º dia de prenhez, observaram, em ratas, aumento significativo nas taxas de perdas pós-implantação e redução significativa nas taxas de viabilidade fetal e no número de fetos por ninhada<sup>11</sup>.

Devido à ausência de consenso na literatura, realizamos o presente trabalho para averiguar os possíveis efeitos deste fármaco administrado durante toda a prenhez da rata albina.

## Métodos

Foram utilizadas ratas (*Rattus norvegicus albinus*) adultas, virgens, pesando aproximadamente 200 gramas, fornecidas pelo Centro de Desenvolvimento de Modelos de Experimentação (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina (UNIFESP/EPM). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP/EPM (parecer nº 1397/04).

Os animais foram mantidos confinados em gaiolas plásticas, no biotério da Disciplina de Histologia, com temperatura ambiente controlada a 22°C e iluminação artificial, obtida com lâmpadas fluorescentes, sendo o fotoperíodo de 12 horas claro (7:00–19:00 h) e 12 horas escuro, com alimentação e água *ad libitum*.

Após um período de sete dias, os animais foram acasalados na proporção de um macho para três fêmeas, por período de duas horas. O início da gestação (dia zero da prenhez) foi determinado pelo encontro de espermatozoides na vagina da rata<sup>12</sup>. Cinquenta ratas prenhes foram distribuídas, aleatoriamente, em cinco grupos numericamente iguais: Contr1, animais não manipulados; Contr2, animais que receberam 6 mL de água destilada; Exp40, Exp120 e Exp360, animais tratados, respectivamente, com 40, 120 e 360 mg/kg por dia de solução oral de mesilato de nelfinavir. O veículo e a droga foram administrados por gavagem, duas vezes ao dia, com intervalo de 12 horas, desde o dia 0 até o 20º dia da prenhez.

O ganho de peso dos animais foi monitorizado por meio de pesagem nos dias zero, 7, 14 e 20 de prenhez. O ganho de peso porcentual foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:  $\Delta\% = (\text{peso no dia } \underline{X} - \text{peso inicial}) \times 100 / \text{peso inicial}$ , onde  $\underline{X}$  indica os dias de pesagem.

Ao termo (20º dia), todos os animais foram anestesiados com mistura de xilazina (0,1 mg/kg) e cetamina (0,1 mg/kg), por via intraperitoneal. Após laparotomia e histerotomia avaliaram-se os seguintes parâmetros: peso das matrizes e dos fetos, número de implantações, de reabsorções, de fetos vivos e mortos, bem como o peso das crias e placentas e presença de óbitos fetais intra-útero e das matrizes. Os fetos foram detalhadamente investigados sob lupa estereoscópica quanto à ocorrência de malformações maiores externas (encurtamento de membros, espinha bífida, fenda palatina, hipospádia e lábio leporino).

Os resultados, após análise de variância, foram analisados por comparações múltiplas pelo teste de Kruskal-Wallis. O nível de rejeição para hipótese de nulidade foi fixado em 5%.

## Resultados

Comparando os cinco grupos estudados em relação ao peso inicial (dia zero) das ratas, notamos ganho ponderal de peso durante toda a prenhez. No entanto, não foram encontradas diferen-

ças significantes entre os grupos estudados (Figura 1).

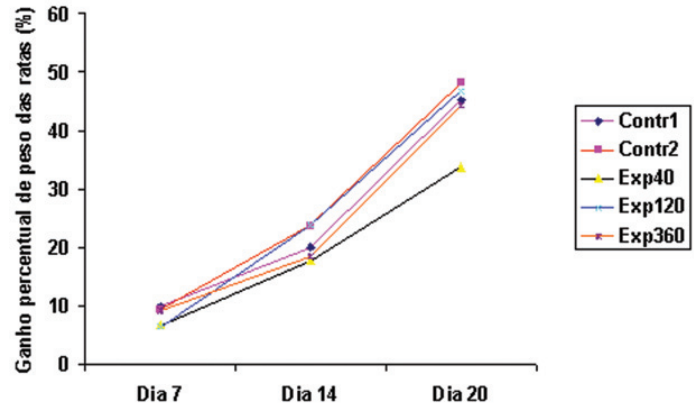


Figura 1 - Percental de ganho de peso nos cinco grupos estudados, a partir do peso inicial. Os pesos foram verificados no 7º, 14º e 20º dia de prenhez.

Quando ao número de fetos, placentas e implantações, verificamos que não ocorreram diferenças entre os grupos de estudo, de tal maneira que os dados foram semelhantes, ou seja, Contr1 = 9,5±0,6; Contr2 = 9,9±0,3; Exp40 = 9,0±0,9; Exp120 = 10,3±0,5 e Exp360 = 9,9±0,9. Igualmente, não houve diferenças significantes quanto ao peso das placentas (Contr1 = 0,6±0,1; Contr2 = 0,6±0,1; Exp40 = 0,7±0,1; Exp120 = 0,7±0,1 e Exp360 = 0,7±0,1 mg) ou dos fetos (Contr1 = 4,1±0,2; Contr2 = 3,9±0,1; Exp40 = 3,9±0,1; Exp120 = 3,9±0,2 e Exp360 = 3,9±0,7 mg). Não foram encontrados casos de reabsorções, malformações fetais maiores externas e óbitos fetais e das matrizes. Estes resultados mostram que não houve diferença significante entre os diversos grupos do experimento (Tabela 1).

Tabela 1 - Efeitos do nelfinavir sobre alguns parâmetros da prenhez da rata. Os dados são média ± erro-padrão da média de dados obtidos em 10 animais em cada grupo. Não houve mortes maternas ou fetais, nem ocorrência de malformações macroscópicas.

	Grupos				
	Contr1	Contr2	Exp40	Exp120	Exp360
Número de fetos	9,5±0,6	9,9±0,3	9,0±0,9	10,3±0,5	9,9±0,9
Número de placentas	9,5±0,6	9,9±0,3	9,0±0,9	10,0±0,4	9,9±0,9
Número de Implantações	9,5±0,6	9,9±0,3	9,0±0,9	10,0±0,4	9,9±0,9
Peso dos fetos (g)	4,1±0,2	3,9±0,1	3,90±0,1	3,86±0,1	3,97±0,7
Peso das placentas (g)	0,66±0,02	0,62±0,02	0,69±0,04	0,67±0,01	0,66±0,02

Em cada parâmetro não se detectaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. Legenda: animais tratados com água destilada; Contr1 (sem manipulação, controle de estresse) e Contr2 (controle de veículo); tratados com solução oral de mesilato de nelfinavir durante toda a prenhez: Exp40 (40 mg/kg), Exp120 (120 mg/kg) e Exp360 (360 mg/kg).

## Discussão

O nelfinavir é inibidor de protease viral com especificidade para o vírus HIV, utilizado com muita frequência nos esquemas de anti-retrovirais combinados para as gestantes contaminadas. Recentemente foi relatado que também inibe a ação da glicoproteína Gp41 viral indutora da apoptose nas células placentárias envolvendo a caspase 3 pela via mitocondrial<sup>13,14</sup>. Possui poucos efeitos colaterais, dentre eles os mais comuns são os distúrbios gastrointestinais de leve intensidade, além de possuir praticidade posológica de duas tomadas diárias, o que facilita a adesão ao tratamento. Sendo assim, é um dos inibidores de protease mais utilizados. No entanto, pouco se sabe sobre as repercussões desse fármaco sobre a gestação.

A dose de nelfinavir administrada no grupo Exp40 foi proporcionalmente semelhante à recomendada para uso terapêutico em humanos, isto é, 40 mg/kg de peso corporal por dia<sup>8</sup>. Os grupos Exp120 e Exp360 foram tratados com doses 3 e 9 vezes superiores à dose menor, porque o metabolismo hepático da rata estima-se ser três vezes mais eficiente do que aquele encontrado em humanos e também porque a depuração renal desses animais é duas vezes mais eficiente<sup>10,11</sup>.

Sabemos que a idade das ratas albinas guarda estreita relação com seu peso, sendo possível calcular um tendo o outro como base. Além disso, há um limite de peso que esses animais atingem, de modo que, ao chegarem a um patamar ponderal corpóreo, o aumento de peso se torna mais limitado<sup>15</sup>. Ao que tudo indica, no presente estudo, o aumento dos pesos das ratas prenhes não foi influenciado pelo uso do nelfinavir durante toda a prenhez. O ganho de peso da rata durante a prenhez, porém, não é homogêneo. Sabe-se que a última semana é a fase de maior ganho de peso em qualquer gestação<sup>15</sup>. Estes dados estão de acordo com os nossos achados, pois o ganho de peso do 20º dia foi significativamente maior do que no 7º dia, em todos os grupos estudados.

Nossos dados estão de acordo com os achados da literatura em que, utilizando nelfinavir nas doses de 200, 500 e 1000 mg/kg de peso, em ratas do 6º ao 17º dia da prenhez, não foram encontradas alterações em relação ao peso das matrizes. O mesmo aconteceu com estudo realizado com nelfinavir na dose de 97,5 mg/dia administrada a ratas do dia inicial da prenhez ao 21º dia. Já com o estavudina<sup>16</sup> e o ritonavir<sup>17</sup>, foi observada redu-

ção do peso materno de ratas durante a gestação. Contudo, os mecanismos de ação destes retrovirais são diferentes do nelfinavir.

Tratando-se de drogas e especialmente de anti-retrovirais, sabe-se que os inibidores da transcriptase reversa ultrapassam com mais facilidade a membrana sincitiotrofoblástica placentária do que os inibidores de protease, que apresentam dificuldade em fazê-lo. No curso da última década foi escrita uma pequena família de genes (*mdr1*, *mdr2* e *mdr3*)<sup>18</sup> com expressão codificada na placenta de roedores, por meio da glicoproteína P. Essa proteína de transporte transmembrana tem como função promover transporte contra gradiente de concentração<sup>19</sup> e exportar compostos orgânicos do citosol para o meio extracelular<sup>20</sup>. O aumento de sua expressividade está diretamente relacionado com o período de duração do uso dos inibidores da protease e, conseqüentemente, queda da concentração intracelular desses fármacos<sup>21</sup>. Cumpre, portanto, o papel de proteger o feto contra agentes teratogênicos; por outro lado, impede que medicamentos como os inibidores de protease atinjam o feto, privando-o de seus benefícios<sup>22</sup>. Além disso, é referido que o nelfinavir liga-se fortemente a proteínas plasmáticas, o que dificulta a sua passagem transplacentária<sup>23</sup>.

Tal fato pode explicar o porquê de o nelfinavir, apesar de ter peso molecular de livre trânsito pela placenta (peso molecular = 660 kDa), não ter atingido os conceitos e conseqüentemente não ter levado a nenhuma alteração dos parâmetros intra-uterinos, como o número de implantações, reabsorções, peso de feto, placentas e óbitos fetais. 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<sup>24</sup>. Nossos dados discordam dos achados da literatura quanto ao número de fetos. Alguns autores, ministrando nelfinavir a ratas durante toda a prenhez, encontraram aumento do número de perdas pós-implantação e redução do número de fetos por ninhada<sup>25</sup>. Deve ser ressaltado que estudos em camundongas normais e prenhes relataram haver aumento da depuração hepática do nelfinavir devido à enzima CYP3A4, o que diminuiria sua atividade sobre o conceito<sup>26</sup>.

Muitos estudos têm referido que a exposição intra-útero de anti-retrovirais, principalmente inibidores de protease, podem estar relacionados com prematuridade e baixo peso ao nascimento<sup>27</sup>. O aumento da incidência de partos prematu-

ros tem sido visto em associação com o uso de nelfinavir<sup>28</sup>. Tais achados não foram observados em nossos resultados.

Assim sendo, esta pesquisa experimental procurou, com os resultados encontrados, colaborar no sentido de mostrar a excelente tolerância das ratas e de seus conceptos com relação ao uso do medicamento durante toda a prenhez.

## Referências

1. Creating effective partnerships for HIV prevention trials: report of a UNAIDS Consultation, Geneva 20-21 June 2005. *AIDS*. 2006;20(6):W1-11.
2. Biehl J. Biotechnology and the new politics of life and death in Brazil: the AIDS model. *Princet J Bioeth*. 2002;5(1):59-74.
3. Wogart JP, Calcagnotto G. Brazil's fight against AIDS and its implications for global health governance. *Healthc Q*. 2006;9(1):76-89.
4. Connor EM, Sperling RS, Gelber R, Kiselev P, Scott G, O'Sullivan MJ, et al. Reduction of maternal-infant transmission of human immunodeficiency virus type 1 with zidovudine treatment. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076 Study Group. *N Engl J Med*. 1994;331(18):1173-80.
5. Bucci AM, Somigliana E, Matrone R, Ferraris G, Rossi G, Grossi E, et al. Combination antiretroviral therapy in 100 HIV-1 infected pregnant women. *Hum Reprod*. 2002;17(2):436-41.
6. Cooper ER, Charurat M, Mofenson L, Hanson IC, Pitt J, Diaz C, et al. Combination antiretroviral strategies for the treatment of pregnant HIV-1 infected women and prevention of perinatal HIV-1 transmission. *J Acquir Imunne Defic Syndr*. 2002;29(5):484-94.
7. Perry CM, Frampton JE, McCormack PL, Siddiqui MA, Cvetkovic RS. Nelfinavir: a review of its use in the management of HIV infection. *Drugs*. 2005;65(15):2209-44.
8. Amato Neto V, Medeiros EAS, Kallás EG, Levi GC, Baldy JLS, Medeiros RSS. *AIDS na prática médica*. São Paulo: Sarvier; 1996. p. 126-36.
9. Burns-Naas LA, Stump DG, Webber S, Holson JF, Masarjian L, Furman G, et al. Absence of reproductive and developmental toxicity in rats following oral dosing with nelfinavir. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2003;38(3):304-16.
10. Burns-Naas LA, Webber S, Stump DG, Holson JF, Masarjian L, Zorbas M. Absence of embryo-fetal toxicity in rats or rabbits following oral dosing with nelfinavir. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2003;38(3):291-303.
11. Figueiró-Filho EA, Duarte G, Silva AAMR, Fonseca BAL, Mussi-Pinhata MM, Quintana SA, et al. Efeitos de drogas anti-retrovirais sobre taxas de fertilidade de ratas Wistar. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2002;24(10):647-52.
12. Hamilton JB, Wolfe JM. The effect of male hormone substance upon birth and prenatal development in the rat. *Anat Rec*. 1938;70(4):433-40.
13. Garg H, Blumenthal R. HIV gp41-induced apoptosis is mediated by caspase-3-dependent mitochondrial depolarization, which is inhibited by HIV protease inhibitor nelfinavir. *J Leukoc Biol*. 2006;79(2):351-62.
14. Miro O, Villarroya J, Garrabou G, Lopez S, Rodriguez de la Concepcion M, Pedrol E, et al. In vivo effects of highly active antiretroviral therapies containing the protease inhibitor nelfinavir on mitochondrially driven apoptosis. *Antivir Ther*. 2005;10(8):945-51.
15. Baba T, Nagahama M, Akiyama N, Miki T. Experimental production of malformations due to acetyl salicylate and phenyl salicylate in rats. *Osaka City Med J*. 1966;12(1):23-9.
16. Barreto RL, de Jesus Simoes M, Amed AM, Soares Junior JM, Oliveira-Filho RM, Kulay L Jr. Stavudine effects on rat pregnancy outcome. *J Obstet Gynaecol Res*. 2004;30(3):242-5.
17. Carvalho AM, Oliveira-Filho RM, Simoes MJ, Amed AA, Kulay L Jr. Effect of chronic ritonavir administration on pregnant rats and their fetuses. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 2004;31(3):229-31.
18. Abou-Donia MB, El-Masry E, Abu-qare AW. Metabolism and toxicokinetics of xenobiotics. In: Derelanko MJ, Hollinger MA, editors. *CRC handbook of toxicology*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press; 2001. p. 757-821.
19. Higgins CF. The ABC of channel regulation. *Cell*. 1995;82(5):693-6.
20. Ichikawa K, Tsutsumi A, Matsuura E, Koike T. Antiphospholipid syndrome. *Intern Med*. 1999;38(2):170-3.
21. Huisman MT, Smit JW, Wiltshire HR, Beijnen JH, Schinkel AH. Assessing safety and efficacy of directed P-glycoprotein inhibition to improve the pharmacokinetic properties of saquinavir coadministered with ritonavir. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;304(2):596-602.
22. Lankas GR, Wise LD, Cartwright ME, Pippert T, Umbenhauer DR. Placental P-glycoprotein deficiency enhances susceptibility to chemically induced birth defects in mice. *Reprod Toxicol*. 1998;12(4):457-63.

23. Motoya T, Thevanayagam LN, Blaschke TF, Au S, Stone JA, Jayewardene AL, et al. Characterization of nelfinavir binding to plasma proteins and the lack of drug displacement interactions. *HIV Med.* 2006;7(2):122-8.
24. Mirochnick M, Dorenbaum A, Holland D, Cunningham-Schrader B, Cunningham C, Gelber R, et al. Concentrations of protease inhibitors in cord blood after in utero exposure. *Pediatr Infect Dis J.* 2002;21(9):835-8.
25. Figueiró-Filho EA, El Beitune P, Rudge MCV, Quintana SM, Marcolin AC, Duarte G. Efeitos das drogas anti-retrovirais sobre o metabolismo glicídico e células de Langerhans de pâncreas de ratas Wistar prenhes. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2004;26(5):369-75.
26. Mathias AA, Maggio-Price L, Lai Y, Gupta A, Unadkat JD. Changes in pharmacokinetics of anti-HIV protease inhibitors during pregnancy: the role of CYP3A and P-glycoprotein. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;316(3):1202-9.
27. Chmait R, Franklin P, Spector SA, Hull AD. Protease inhibitors and decreased birth weight in HIV-infected pregnant women with impaired glucose tolerance. *J Perinatol.* 2002;22(4):370-3.
28. Garcia-Terjedor A, Perales A, Maiques V. Protease inhibitor treatment in HIV pregnant women. Is it safe for newborns? *Int J Gynaecol Obstet.* 2002;76(2):175-6.