

ADRIANA WAGNER¹
ADELINO MOREIRA DE CARVALHO²
MARY UCHIYAMA NAKAMURA³
RICARDO SANTOS SIMÕES⁴
TEREZA MARIA PEREIRA FONTES⁵
SILVIA ESPIRIDÃO⁶
LUIZ KULAY JÚNIOR⁷

Análise morfológica e fisiológica dos fígados e rins de ratas prenhes e seus fetos tratados pela associação zidovudina, lamivudina e ritonavir durante toda a prenhez

Morphological and physiological analysis of livers and kidneys of pregnant rats and their fetuses treated by the association of zidovudine, lamivudine and ritonavir for the whole period of pregnancy

Artigo original

Palavras-chave

Zidovudina/administração & dosagem
Lamivudina/administração & dosagem
Ritonavir/administração & dosagem
Zidovudina/toxicidade
Lamivudina/toxicidade
Ritonavir/toxicidade
Rim/efeitos de drogas
Fígado/efeitos de drogas
Anti-retrovirais
Ratos
Prenhez

Keywords

Zidovudine/administration & dosage
Lamivudine/administration & dosage
Ritonavir/administration & dosage
Zidovudine/toxicity
Lamivudine/toxicity
Ritonavir/toxicity
Kidney/drug effects
Liver/drug effects
Antiretrovirals
Rats
Pregnancy, animal

Resumo

OBJETIVO: avaliar os efeitos da administração da associação zidovudina-lamivudina-ritonavir nos fígados e rins de ratas prenhes e seus conceptos do ponto de vista morfológico e fisiológico. **MÉTODOS:** 40 ratas albinas prenhes foram aleatoriamente divididas em 4 grupos: 1 controle (Ctrl: controle de veículo) e 3 experimentais (Exp1x, Exp3x e Exp9x). Estes últimos foram tratados por solução oral de zidovudina/lamivudina/ritonavir (Exp1x: 10/5/20 mg/kg; Exp3x: 30/15/60 mg/kg; Exp9x: 90/45/180 mg/kg). As drogas e o veículo foram administrados por gavagem, desde o 1º até o 20º dia de prenhez. No último dia do experimento, todos os animais foram anestesiados e sangue foi retirado da cavidade cardíaca para avaliação sérica das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), por método calorimétrico, bem como da ureia, determinada por método cinético-enzimático, e creatinina, por método cinético-colorimétrico. Em seguida, fragmentos dos fígados e rins maternos e fetais foram coletados, fixados em formol a 10% e processados segundo os métodos histológicos para inclusão em parafina. Cortes com 5 µm de espessura foram corados pela hematoxilina-eosina (HE) e analisados por microscopia de luz. Na leitura das lâminas, considerou-se o padrão de normalidade para fígado e rins, tais como: hepatócitos, espaço porta íntegros e veias hepáticas bem definidas. Nos rins, a presença de corpúsculos renais, túbulos contorcidos e alças de Henle típicos. Nos fígados fetais considerou-se, ainda, a morfologia das células da linhagem eritrocitária nas diferentes fases do desenvolvimento, bem como os megacariócitos. Quando houve alteração da coloração padrão estabelecida para as estruturas hepáticas e renais, alteração na morfologia de núcleos, rompimento de limites de alguma organela citoplasmática, presença de congestão vascular, tudo isso foi entendido como provavelmente provocado pelas drogas em sua(s) dose(s) de aplicação. A avaliação estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA), completada pelo teste de Tukey-Kramer ($p < 0,05$). **RESULTADOS:** os fígados maternos dos grupos Ctrl, Exp1x e Exp3x mostraram hepatócitos típicos, espaço porta íntegros e veias hepáticas com aspecto normal. No fígado materno do grupo Exp9x, foram encontrados hepatócitos com sinais de atrofia e apoptose (eosinofilia citoplasmática e núcleos picnóticos). Além disso, identificou-se vasodilatação dos capilares sinusoides (congestão). Os rins maternos dos grupos Ctrl e Exp1x apresentaram-se normais, com corpúsculos renais, túbulos contorcidos e alças de Henle típicos. Já nos grupos Exp3x e Exp9x, foram encontrados congestão vascular, glomerúlos pequenos ricos em células contendo núcleos hiper cromáticos, sendo mais intensos no Exp9x. Com relação aos fígados e rins fetais, não foram observadas alterações morfológicas ou fisiológicas nos grupos estudados. Encontrou-se aumento significativo nos níveis da AST ($305,70 \pm 55,80$; $p < 0,05$) e da creatinina ($0,50 \pm 0,09$; $p < 0,05$) no grupo Exp9x. **CONCLUSÕES:** nossos resultados evidenciam que a administração da associação zidovudina/lamivudina/ritonavir a ratas prenhes em altas doses causa alterações morfológicas e funcionais nos fígados e rins maternos. Não houve alterações nem morfológicas nem fisiológicas nos fígados e rins fetais.

Abstract

PURPOSE: to evaluate the effect of administration of three different doses of the zidovudine/lamivudine/ritonavir combination on the liver and kidneys of pregnant rats and their concepts from a morphological and physiological standpoint. **METHODS:** 40 pregnant EPM-1 Wistar rats were randomly divided into 4 groups: 1 control (Ctrl: drug vehicle control,

Correspondência:

Luiz Kulay Júnior
Rua Napoleão de Barros, 715, 8º andar – Vila Clementino
CEP 04024-200 – São Paulo (SP), Brasil
Tel./Fax (11) 5572-260/5571-0761
E-mail: kulay.toco@epm.br ou kulay@proex.epm.br

Recebido

20/9/2010

Aceito com modificações

9/11/2010

Departamento de Obstetrícia da Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina – UNIFESP – São Paulo (SP), Brasil.

¹ Professora Doutora do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS – Alfenas (MG), Brasil.

² Professor Doutor do Serviço de Clínica Médica da Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS – Alfenas (MG), Brasil.

³ Professora Associada e Livre-Docente do Departamento de Obstetrícia da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP – São Paulo (SP), Brasil.

⁴ Médico Assistente do Hospital Universitário da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – USP São Paulo (SP), Brasil – Pós-Graduando (Mestrado) do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – USP – São Paulo (SP), Brasil.

⁵ Professora do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Universidade Gama Filho – UGF – Rio de Janeiro (RJ), Brasil.

⁶ Professora Doutora do Departamento de Obstetrícia e Pediatria da Faculdade de Medicina do ABC – FMABC – Santo André (SP), Brasil.

⁷ Professor Titular do Departamento de Obstetrícia da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP – São Paulo (SP), Brasil.

n=10) and 3 experimental groups: Exp1x, Exp3x and Exp9x. An oral solution of the zidovudine/lamivudine/ritonavir combination was administered to the experimental groups from the day 0 to day 20 of pregnancy: Exp1x=10/5/20 mg/kg; Exp3x=30/15/60 mg/kg; Exp9x=90/45/180 mg/kg. On the 20th pregnancy day the rats were anesthetized and blood was taken directly from the ventricular chambers for further biochemical determinations: aspartate (AST) and alanine (ALT) aminotransferases (Calorimetric method), urea nitrogen (BUN) by an enzymatic-kinetic method, and creatinine by a kinetic-calorimetric method. Maternal and fetal liver and kidney samples were taken, fixed in 10% formaldehyde and processed histologically for paraffin embedding. Five μ m-thick fragments of maternal and fetal livers and kidneys were stained with hematoxylin-eosin, being analyzed by light microscopy. To interpret the results, the well-known pattern of normality for livers and kidneys was considered on the basis of the following structures: hepatocytes, portal structure, hepatic veins, renal corpuscles, renal tubules and loop of Henle. Regarding the fetal livers, we also considered the erythrocytes in their different stages of development as well as the megacariocytes. If there was a change in the established staining pattern for liver and kidney structures, changes in nuclear morphology, rupture of some cytoplasmic organelles, and presence of vascular congestion, this was considered to be due to the drug doses. Results were submitted to analysis of variance (ANOVA) and to the Tukey-Kramer multiple comparisons test ($p<0.05$). **RESULTS:** no morphological changes were observed in the maternal livers of the Ctrl, Exp1x and Exp3x groups. In the maternal liver of the Exp9x group, hepatocytes showed signs of atrophy and apoptosis (eosinophilic cytoplasm and pycnotic nuclei) and marked sinusoid capillary vasodilation (congestion) was observed. The maternal kidneys of the Ctrl and Exp1x groups were normal, with renal corpuscles, convoluted tubules and typical loops of Henle. In contrast, the Exp3x and Exp9x groups showed vascular congestion and small glomeruli rich in cells containing hyperchromatic nuclei which were more intense in Exp9x. Regarding the fetal organs, no morphological or physiological changes were observed. A significant increase of AST (305.70 ± 55.80 , $p<0.05$) and creatinine (0.50 ± 0.09 , $p<0.05$) was observed in group Exp9x. **CONCLUSIONS:** our results show that the administration of the zidovudine, lamivudine and ritonavir combination to pregnant rats at high doses caused morphological and physiological changes in the maternal liver and kidneys. On the other hand, there were no changes in fetal organs.

Introdução

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA ou AIDS) surgiu há quase três décadas e foi rapidamente disseminada por todos os continentes, com crescentes índices de mortalidade, representando uma das infecções mais temidas dos séculos 20 e 21. No entanto, o tratamento dos infectados pelo HIV com medicamentos antirretrovirais diminuiu significativamente a taxa de mortalidade desde a introdução da terapia antirretroviral combinada em 1996¹. Assim, durante a última década, a terapia antirretroviral combinada de alta potência, denominada HAART (*highly active antiretroviral therapy*) veio atenuar esses índices, controlando as infecções oportunistas e aumentando a sobrevida^{2,3}.

Essa terapia, que compreende a combinação de drogas, promove uma importante e sustentada supressão da replicação viral, elevando a sobrevida dos pacientes soropositivos e, com isso, aumentando a prevalência dessa infecção⁴. Essa redução da mortalidade é particularmente evidente em países industrializados, de alta renda, onde o acesso aos cuidados de saúde e tratamentos antirretrovirais é facilitado⁵.

Atualmente, temos cinco grupos de agentes antirretrovirais com diferentes mecanismos de ação: inibidores da transcriptase reversa (NRTIs), inibidores da protease (PI), inibidores de fusão viral (FI), análogos nucleosídeos e não análogos de nucleosídeos e inibidores da integrase. Alguns ainda não são usados em mulheres grávidas⁶. A combinação desses medicamentos, usando de dois a três compostos, é que se nomeia terapia antirretroviral de alta potência⁷.

No entanto, apesar de tais fatos, deve-se salientar que estudos que avaliem a segurança desses medicamentos durante a gravidez são necessários, especialmente quanto

à sua toxicidade e potencial teratogênico. O uso de uma droga durante a gravidez exige a investigação de seus efeitos sobre o feto e o recém-nascido, principalmente em relação à teratogenicidade, mutagenicidade e carcinogênese, dependendo da farmacocinética e toxicidade da droga e da transferência transplacentária. Dessa forma, o efeito de uma droga sobre o feto depende da dose ingerida pela mãe, da idade gestacional em que o feto foi exposto, da duração da exposição, da interação com outras drogas e de outros fatores, tais como a genética materna e fetal⁸. Com o objetivo de esclarecer a ação combinada de medicamentos antirretrovirais durante a gravidez, decidiu-se estudar a ação da associação zidovudina/lamivudina/ritonavir sobre a morfologia e fisiologia hepática e renal de ratas prenhes.

Métodos

Foram usadas ratas (*Rattus norvegicus albinus*) adultas, virgens, pesando aproximadamente 250 g, fornecidas pelo Centro de Desenvolvimento de Modelos de Experimentação (CEDEME) da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição (parecer nº 0749/07).

Os animais foram 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 (7h00min – 19h00min) e 12 horas escuro (19h00min – 7h00min), 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.

Quarenta ratas prenhes foram então distribuídas ao acaso em quatro grupos de animais, como descrito a seguir: GCtrl (n=10), ratas que foram tratadas diariamente com 0,5 mL de propilenoglicol por via oral (controle do veículo) e três grupos experimentais. Os experimentais foram assim distribuídos: GExp1x (n=10), ratas tratadas com uma associação oral de zidovudina/lamivudina/Ritonavir, correspondendo à dose diária de 10 mg/kg de zidovudina mais 5 mg/kg de lamivudina mais 20 mg/kg de ritonavir (zidovudina e lamivudina dos Laboratórios GlaxoSmithKline, London; ritonavir do laboratório Abbott, North Chicago, Illinois); GExp3x (n=10) sob tratamento similar ao grupo anterior, sendo as ratas tratadas diariamente com 30, 15 e 60 mg/kg de zidovudina/lamivudina/ritonavir, respectivamente. Finalmente, o GExp9x (n=10), constituído por ratas tratadas com 90, 45 e 180 mg/kg de zidovudina/lamivudina/ritonavir, respectivamente. A droga e o veículo (propilenoglicol) foram administrados por gavagem em dose única diária, com um volume final de 0,5 mL, desde o dia 0 até o 20º dia de prenhez.

Ao termo (20º dia), todos os animais foram anestesiados com mistura de xilazina (20 mg/kg) e cetamina (100 mg/kg), por via intraperitoneal. Após tóraco-laparotomia, 2-3 mL de sangue materno foram retirados diretamente das câmaras ventriculares para as determinações bioquímicas da aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), ureia e creatinina, as quais foram encaminhadas ao Laboratório Central do Hospital São Paulo (UNIFESP). As enzimas plasmáticas AST (aspartato aminotransferase) e ALT (alanina aminotransferase) foram utilizadas como marcadores bioquímicos para avaliar o dano hepático agudo precoce, sendo determinadas pelo método colorimétrico de Reitman e Frankel⁹. A função renal foi analisada pela determinação da ureia plasmática determinada por método cinético-enzimático¹⁰ e dos níveis de creatinina por método cinético-colorimétrico¹¹ (reativos Labtest[®]).

Também foram retiradas amostras dos fígados e rins maternos e fetais que foram mergulhadas em formol a 10% tamponado (tampão fosfato 10 mM, pH 7,4) e processados para estudo histológico à microscopia de luz. O preparo e o estudo histológicos foram realizados na Disciplina de Histologia e Biologia Estrutural do Departamento de Morfologia e Genética da UNIFESP-EPM. Após os procedimentos habituais de inclusão em parafina, os blocos foram cortados (5 µm) e as lâminas coradas pela hematoxilina-eosina (HE). As lâminas foram avaliadas em microscópio de luz marca Carl Zeiss.

Na leitura das lâminas, considerou-se padrão de normalidade para o fígado: bom estado de conservação, homogeneidade de aspecto, identificação de lóbulos

hepáticos íntegros, espaço porta íntegro e veias hepáticas bem definidas; cordões sinusoides presentes, íntegros, confluindo para veia centro-lobular. Nos capilares sinusoides, entendeu-se como normal a presença de algumas hemácias. Nas células hepáticas, consideraram-se normais aquelas com um ou mais núcleos íntegros, em geral centralizados, e nucléolos bem evidentes. No citoplasma, foi considerado padrão de normalidade encontrar áreas basófilas e eosinófilas. Nos fígados fetais, considerou-se ainda a morfologia das células da linhagem eritrocitária nas diferentes fases do desenvolvimento e os megacariócitos.

Nos rins, a normalidade obedeceu aos quesitos: bem conservados, apresentando corpúsculos renais e túbulos contorcidos proximais e distais íntegros; os glomérulos formados por capilares, podócitos, células endoteliais e mesangiais sem alterações histológicas. Outros itens avaliados: cápsula de Bowman íntegra, presença de células cúbicas ou poliédricas, apresentando citoplasma eosinófilo e núcleo arredondado. Na região medular, analisaram-se as alças de Henle junto aos capilares e túbulos coletores, estes com citoplasma bem delimitado e núcleo esférico, quando dentro da normalidade.

Quando houve alteração da coloração padrão estabelecida para as estruturas hepáticas, alteração na morfologia de núcleos, rompimento de limites de alguma organela citoplasmática e presença de congestão vascular, isso foi entendido como provavelmente provocado pelas drogas em suas doses de aplicação.

Para análise estatística dos dados das dosagens plasmáticas, foi usada a análise de variância (ANOVA) complementada pelo teste de Comparações Múltiplas de Tukey-Kramer. Para tanto, usou-se o software SPSS para Windows 3.1 (p<0,05).

Resultados

Os dados das dosagens bioquímicas mostraram maior concentração nos níveis séricos da aspartato aminotransferase (AST) (mU/mL) no grupo Exp9x em relação aos outros grupos de estudo (Exp9x = 305,70±55,80* > Ctrl = 126,40±32,10 = Exp1x = 115,60±42,70 = Exp3x = 123,60±10,20; p<0,05). O mesmo foi evidenciado na concentração da creatinina (mg/100 mL) (Exp9x = 0,50±0,09* > Ctrl = 0,41±0,05 = Exp1x = 0,42±0,04 = Exp3x = 0,40±0,07; p<0,05). Não houve diferenças significantes entre os grupos estudados quanto aos níveis de alanina aminotransferase (ALT) e ureia. Os dados estão expressos na Tabela 1.

Nos fígados maternos, notou-se que os grupos Ctrl, Exp1x e Exp3x apresentaram padrões de normalidade. Foram facilmente visualizados lóbulos hepáticos, espaços porta e veias hepáticas bem delineados. Os hepatócitos formavam cordões confluentes para a

Tabela 1 - Efeitos do tratamento combinado da zidovudina/lamivudina/ritonavir durante todo o período de gestação da rata nos níveis séricos da aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), ureia e creatinina maternos ao termo

Grupos	AST (mU/mL)	ALT (mU/mL)	Ureia (mg/100 mL)	Creatinina (mg/100 mL)
Ctrl (n=10)	126,4±32,1	72,1±11,3	52,1±4,9	0,4±0,1
Exp1 (n=10)	115,6±42,7	81,7±16,0	60,4±15,1	0,4±0,1
Exp2 (n=10)	123,6±10,2	74,9±13,7	59,6±9,4	0,4±0,1
Exp3 (n=10)	305,7±55,8*	136,5±54,6	49,7±15,1	0,5±0,1*

Código: Dados representados em média ± desvio padrão das determinações em duplicata. Grupos de ratas prenhes (n: número de animais ao termo) tratadas durante toda a gestação com zidovudina + lamivudina + ritonavir por via oral (gavagem), em doses diferentes para cada grupo: Exp1=10+5+20 mg/kg; Exp2 =30+15+60 mg/kg; Exp3= 90+45+180 mg/kg, respectivamente.

Ctrl: ratas tratadas com propilenoglicol.

*p<0,05.

veia centro-lobular. Entre os cordões, observavam-se sinusoides hepáticos com núcleos arredondados e volumosos, geralmente eucromáticos (Figura 1A). No grupo Exp9x, que recebeu 90, 45 e 180 mg/kg de zidovudina/lamivudina/ritonavir, respectivamente, o fígado apresentou alterações morfológicas, tais como: alguns hepatócitos apresentando dois núcleos, outros pequenas áreas claras no citoplasma (sinais de infiltração gordurosa), eosinofilia citoplasmática e núcleo heterocromático sugestivo de atrofia e apoptose. Além disto, identificou-se vasodilatação dos capilares sinusoides (Figura 1B). Esse quadro morfológico esteve presente em todas as lâminas dos animais do grupo Exp9x, evidenciando alteração abrangente e significativa.

A morfologia dos rins maternos apresentou-se muito semelhante nos grupos Ctrl e Exp1x, nos quais se observaram corpúsculos renais e túbulos contorcidos proximais e distais dentro dos padrões de normalidade. No entanto, no Exp3x notou-se dilatação dos vasos sanguíneos peritubulares e alguns glomérulos congestos com alguns núcleos hiper cromáticos (Figura 1C). No Exp9x, houve nítida dilatação dos vasos sanguíneos peritubulares e foram identificados glomérulos de menor tamanho, ricos em células contendo núcleos intensamente corados (heterocromáticos) e túbulos contorcidos com células apresentando citoplasma eosinofílico (Figura 1D).

Quanto aos fígados fetais, não foram observadas quaisquer alterações à microscopia de luz. Observaram-se núcleos de hepatócitos bem evidentes, células morfológicas da linhagem eritrocitária em diferentes fases do desenvolvimento e megacariócitos. Não se evidenciaram os limites dos lóbulos hepáticos, padrão compatível com a normalidade morfológica nessa etapa do desenvolvimento da cria (Figura 1E). O aspecto morfológico dos rins fetais se mostrou semelhante em todos os grupos estudados, tanto no córtex quanto na medula, sem sinais de alteração celular. Observaram-se glomérulos, túbulos contorcidos (na cortical), e ductos coletores e alças de Henle (na medular) típicos (Figura 1F).

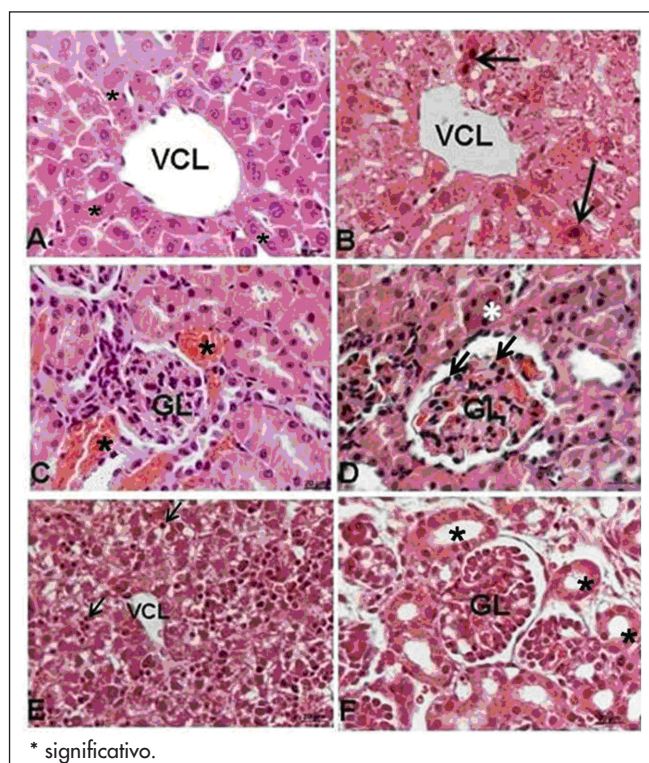


Figura 1 - Fotomicrografias de fígados e rins de ratas e de seus conceptos tratadas com a associação crônica de zidovudina, lamivudina e ritonavir durante toda a prenhez. Em A notar fígado de rata pertencente ao grupo Exp2, mostrando veia centro-lobular (VCL) e cordões de hepatócitos típicos (asteriscos). Em B fígado de rata pertencente ao grupo Exp3, onde se notam algumas células com citoplasma eosinofílico e núcleos heterocromáticos (setas). Em C observar rim de rata pertencente ao grupo Exp2 onde se notam glomérulo (GL) e vasos sanguíneos dilatados e congestos (*) e em D rim de rata pertencente ao grupo Exp3, onde se observa glomérulo (GL) contendo núcleos heterocromáticos (setas) e parte de túbulo contorcido proximal eosinofílico (*). Em E notar parte de fígado de feto pertencente ao grupo Exp3 mostrando veia centro-lobular (VCL) e hemácias nucleadas (setas) e em F rim de feto pertencente ao grupo Exp3 mostrando glomérulo (GL) e túbulos contorcidos (asterisco). H.E. 400X.

Discussão

As doses administradas de zidovudina/lamivudina/ritonavir no grupo GExp1x são proporcionalmente semelhantes às recomendadas para uso terapêutico em humanos, isto é, respectivamente 10/5/20 mg/kg de peso

corporal por dia. Já em GExp3x e GExp9x os animais foram tratados com doses três e nove vezes superiores à dose menor, porque o metabolismo hepático da rata é três vezes mais rápido do que o dos humanos e também porque a depuração renal desses animais é duas vezes mais rápida^{12,13}.

Com relação aos resultados morfológicos obtidos em Ctrl, Exp1x e Exp3x, não se observaram quaisquer alterações à microscopia de luz tanto nos fígados maternos quanto de suas crias. No entanto, nas matrizes do Exp9x, as que receberam a maior dose da associação zidovudina (90 mg/kg), lamivudina (45 mg/kg) e ritonavir (180 mg/kg), foi possível notar a presença de núcleos hiperclômicos e com eosinofilia citoplasmática nos hepatócitos, representando sinais de degeneração celular. O achado de núcleos binucleados nesse grupo é sinal provável de concomitante proliferação celular. Já o achado de áreas claras nos hepatócitos é sugestivo da presença de infiltração gordurosa. Relata-se que a administração da associação de lamivudina, zidovudina e indinavir leva a aumento em 2,5 vezes na expressão gênica da enzima málico lipogênica. Similar efeito potencializador também foi observado utilizando inibidores da transcriptase reversa (NRT) na expressão do gene da ácido graxo sintase¹⁴. Isso pode induzir a aumento do metabolismo dos lipídeos (hiperlipidemia) e dos carboidratos (hiperglicemia), levando à lipodistrofia.

Os valores bioquímicos da avaliação dos níveis séricos de AST, ALT, ureia e creatinina obtidos no grupo Ctrl estão dentro dos padrões de normalidade obtidos em ratos norvegicus^{15,16}.

Com relação às enzimas analisadas, houve ligeiro aumento, porém não significativo, nos níveis de ALT de Exp9x, quando comparado aos outros grupos. A AST se mostrou mais elevada, com aumento significativo em Exp9x em comparação aos demais grupos. A AST possui, além da fração citoplasmática, frações em mitocôndrias, elevando-se em geral após a ALT, em resposta a agressões mais intensas¹⁷.

Alterações na ALT seriam esperadas, pois quando há agressão hepática, essa enzima é a que mais precocemente se eleva¹⁸. Deve ser registrado que o esgotamento da ALT ocorre na presença de alterações hepáticas intensas (cirrose, hepatites agudas, tóxicas e crônicas e colestases)¹⁹. Em nosso estudo, o mais provável é que essa enzima tenha diminuído em Exp9x, sem significado estatístico.

Notou-se aumento significativo da AST em Exp9x. A hipótese explicativa seria que, provavelmente, a enzima se elevou porque ocorreu dano importante nos hepatócitos. Assim, a ocorrência das lesões hepáticas observadas em Exp9x poderiam ter ocasionado o esgotamento dos níveis de ALT e a elevação da AST²⁰. Por isso, nossos achados histológicos são condizentes com as alterações hepáticas notadas.

As lesões hepáticas maternas observadas em Exp9x ocorreram provavelmente em razão do ritonavir, com base nos dados publicados na literatura^{13,21,22}.

Deve-se notar que as alterações histológicas hepáticas provocadas pela associação dessas três drogas foram bem menos pronunciadas quando comparadas a experimentos que utilizaram zidovudina, lamivudina e ritonavir, isoladamente. Foi relatado que alterações hepáticas já podem ser observadas a partir de doses menores de ritonavir¹³, o que reforça a hipótese de a lamivudina diminuir os efeitos tóxicos do ritonavir. Essa diminuição do efeito tóxico do ritonavir na associação com a zidovudina também foi observada no fígado materno²³. É relatado que os efeitos adversos do ritonavir (37%) são mais intensos quando usado de forma isolada do que quando associado a outro inibidor da protease, no caso, como o saquinavir (16%)²⁴. Por isto mesmo, atualmente preconiza-se que o ritonavir seja utilizado em baixas doses, em combinação com outros antirretrovirais a fim de atuar como reforço terapêutico no aumento da eficácia do tratamento e na minimização dos efeitos adversos.

Outra hipótese diz respeito à farmacocinética das drogas em questão, como a interação medicamentosa no nível intestinal relativamente à absorção. Sabe-se que a glicoproteína P (gp-P) é encontrada em diferentes territórios e pode estar envolvida no fenômeno de modificação da absorção, distribuição e eliminação dessas drogas²⁵.

É presumível que a adição da lamivudina pode ter atenuado a ação do ritonavir sobre o sistema metabólico enzimático P450, reduzindo seus níveis circulantes e, conseqüentemente, diminuindo a toxicidade materna. A lamivudina pode ter ativado também a gp-P intestinal, renal e hepatobiliar, contribuindo para diminuir os níveis séricos do ritonavir, por diminuir sua absorção intestinal²⁶ e/ou aumentar sua eliminação²⁷.

Quanto aos rins maternos, alterações histológicas foram observadas nos grupos Exp3x e Exp9x (em doses 3 e 9 vezes maiores que a terapêutica). Nestes grupos, foram evidenciadas alterações principalmente na região cortical, sendo mais intensas em Exp9x. Pela morfologia, notamos glomérulos menos ativos neste último grupo, contudo sem acarretar alterações bioquímicas nos níveis séricos de ureia compatíveis com disfunção renal. No entanto, os níveis séricos de creatinina mostraram-se elevados.

Quanto à avaliação da função renal, não se encontrou aumento nos níveis de ureia, que podem ter se elevado nas fases mais iniciais da agressão. No entanto, observou-se aumento significativo no nível de creatinina, que pode ter se elevado mais tardiamente. Esses achados sugerem que, apesar da lesão estrutural em Exp9x, a reserva funcional renal foi suficiente para tolerar a agressão promovida pela combinação dessas drogas, nas doses e período administrado, o que justifica o achado dos níveis normais de ureia e elevação da creatinina.

A despeito de a lamivudina ser excretada predominantemente pela via renal, tanto por filtração glomerular quanto por secreção tubular ativa, nossos achados não confirmam ter sido ela a principal causadora da lesão renal observada em Exp9x, embora não se possa descartar que o ritonavir possa ter contribuído, de modo importante, para tal ocorrência.

Mesmo considerando não ser a via renal a principal via de eliminação do ritonavir (em torno de 11% apenas), essa hipótese se justifica pelo fato de que, em outros experimentos, nos quais o ritonavir foi utilizado em terapia combinada com outro inibidor de protease (lopinavir/ritonavir) ou com um análogo nucleosídico inibidor da transcriptase reversa (zidovudina/ritonavir) em doses semelhantes às administradas em nosso experimento, a lesão renal ocorreu de forma mais acentuada, tanto com o uso de doses elevadas (nove vezes a dose terapêutica) quanto com doses menores (três vezes a dose terapêutica). Esses fatos sugerem fortemente que ele possa ter contribuído para a nefrotoxicidade observada neste e em outros estudos^{22,23}.

Não houve alterações morfológicas hepáticas e renais nos conceitos dos grupos estudados, o que poderia ser explicado pela restrita passagem da lamivudina e do ritonavir pela barreira placentária. Em vários experimentos previamente

publicados envolvendo outros antirretrovirais, não houve alteração estrutural nos fígados e rins fetais, confirmando nossos achados^{13,22,23,28-32}. Tais achados provavelmente se devem à relatada proteção que a glicoproteína P (gp-P) placentária (proteína de transporte transmembrana que existe em grande concentração na superfície materna da placenta) exerceu ao impedir que quantidades apreciáveis tanto do ritonavir quanto da lamivudina ultrapassassem a barreira placentária^{13,23,33,34}.

A discrepância entre as observações do uso dos antirretrovirais isolados ou em associações, bem como as diferentes expressões da gp-P em ratos, camundongos e nos seres humanos, pode ser explicada pelos diversos mecanismos envolvidos na regulação da expressão da gp-P entre as espécies. Parece óbvio que a gp-P está presente na placenta desde os estágios iniciais da gestação, mudando sua expressão ao termo, o que pode influenciar nos efeitos de xenobióticos sobre o feto³⁵.

Em síntese, nosso trabalho mostrou que a associação zidovudina-lamivudina-ritonavir não provocou qualquer alteração nos fígados e rins fetais. Por outro lado, foi deletéria aos fígados e rins maternos, provocando lesões menos intensas quando comparada ao uso da lamivudina ou do ritonavir de forma isolada durante a prenhez das ratas.

Referências

1. Sturt AS, Dokubo EK, Sint TT. Antiretroviral therapy (ART) for treating HIV infection in ART-eligible pregnant women. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010;(3):CD008440.
2. Reshi P, Lone IM. Human immunodeficiency virus and pregnancy. *Arch Gynecol Obstet*. 2010;281(5):781-92.
3. Vogel M, Schwarze-Zander C, Wasmuth JC, Spengler U, Sauerbruch T, Rockstroh JK. The treatment of patients with HIV. *Dtsch Arztebl Int*. 2010;107(28-29):507-15.
4. Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration. Life expectancy of individuals on combination antiretroviral therapy in high-income countries: a collaborative analysis of 14 cohort studies. *Lancet*. 2008;372(9635):293-9.
5. Braitstein P, Brinkhof MW, Dabis F, Schechter M, Boule A, Miotti P, et al. Mortality of HIV-1-infected patients in the first year of antiretroviral therapy: comparison between low-income and high-income countries. *Lancet*. 2006;367(9513):817-24.
6. Recommendations for use of antiretroviral drugs in pregnant HIV-1-infected women for maternal health and interventions to reduce perinatal HIV transmission in the United States [Internet]. 2010 [cited 2010 Jun 20]. Available from: <<http://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/PerinatalGL.pdf>>
7. Ray S, Fatima Z, Saxena A. Drugs for AIDS. *Mini Rev Med Chem*. 2010;10(2):147-61.
8. Shiverick KT, Slikker W Jr, Rogerson SJ, Miller RK. Drugs and the placenta - a workshop report. *Placenta*. 2003;24 Suppl A:S55-9.
9. Reitman S, Frankel S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am J Clin Pathol*. 1957;28(1):56-63.
10. MacKay EM, MacKay LL. The concentration of urea in the blood of normal individuals. *J Clin Invest*. 1927;4(2):295-306.
11. Jaffé M. Ueber den Niederschlag, welchen Pikrinsäure in normalem Harn erzeugt und über eine neue reaction des kreatinins. *Z Physiol Chem*. 1886;10(5):391-400.
12. Travlos GS, Morris RW, Elwel MR, Duke A, Rosenblum S, Thompson MB. Frequency and relationships of clinical chemistry and liver and kidney histopathology findings in 13-week toxicity studies in rats. *Toxicology*. 1996;107(1):17-29.
13. Carvalho AM, Simões RS, Oliveira FHM, Simões MJ, Oliveira-Filho RM, Nakamura MU, et al. Análise morfológica dos fígados e rins no binômio materno-fetal após tratamento de ratas prenhes com ritonavir durante toda a prenhez. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2007;29(7):346-51.
14. Roche R, Poizot-Martin I, Yazidi CM, Compe E, Gastaut JA, Torresani J, et al. Effects of antiretroviral drug combinations on the differentiation of adipocytes. *AIDS*. 2002;16(1):13-20.
15. Silva FN, Refinetti RA, Eulálio JMR. Avaliação bioquímica dos efeitos do pré-condicionamento isquêmico após isquemia e reperfusão hepática em ratos. *Rev Col Bras Cir*. 2006;33(6):393-7.
16. Moreira MB, Montero EFS, Fagundes DJ, Chida VV, Ramalho CEB, Juliano Y. A função renal de ratos espontaneamente

- hipertensos submetidos ao pneumoperitônio. *Acta Cir Bras*. 2002;17(3):168-76.
17. Andriolo A, coordenador. *Guia de medicina ambulatorial e hospitalar da UNIFESP-EPM: medicina laboratorial*. São Paulo: Manole; 2005.
 18. Nichols WG, Steel HM, Bonny T, Adkison K, Curtis L, Millard J, et al. Hepatotoxicity observed in clinical trials of apilavirac (GW873140). *Antimicrob Agents Chemoth*. 2008;52(3):858-65.
 19. Kondo Y, Kobayashi K, Kobayashi T, Shiina M, Ueno Y, Satoh T, et al. Distribution of the HLA class I allele in chronic hepatitis C and its association with serum ALT level in chronic hepatitis C. *Tohoku J Exp Med*. 2003;201(2):109-17.
 20. Miller O, Ferreira AC, Nery ALB, Barreto CM, Pecego GF, Porto JAF, et al. *Laboratório para o clínico*. 7a ed. São Paulo: Atheneu; 1991.
 21. Denissen JF, Grabowski BA, Johnson MK, Buko AM, Kempf DJ, Thomas SB, et al. Metabolism and disposition of the HIV-1 protease inhibitor ritonavir (ABT-538) in rats, dogs, and humans. *Drug Metab Dispos*. 1997;25(4):489-501.
 22. Cunha AM, Hagemann CC, Simões RS, Oliveira-Filho RM, Simões MJ, Soares JM Jr, et al. Effects of lopinavir-ritonavir combined therapy during the rat pregnancy. Morphological and biochemical aspects. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2007;133(1):60-3.
 23. Fontes TMP, Nakamura MU, Simões RS, Mattar R, Espiridião S, Martins-Filho RO, et al. Effects of the association zidovudine plus ritonavir during rat pregnancy: Morphological and biochemical aspects. *Clin Exp Obstet Gynecol*. In press 2010.
 24. Kirk O, Katzenstein TL, Gerstoft J, Mathiesen L, Nielsen H, Pedersen C, et al. Combination therapy containing ritonavir plus saquinavir has superior short-term antiretroviral efficacy: a randomized trial. *AIDS*. 1999;13(1):F9-16.
 25. Marzolini C, Kim RB. Placental transfer of antiretroviral drugs. *Clin Pharmacol Ther*. 2005;78(2):118-22.
 26. Huisman MT, Smit JW, Schinkel AH. Significance of P-glycoprotein for the pharmacology and clinical use of HIV protease inhibitors. *AIDS*. 2000;14(3):237-42.
 27. Camus M, Delomenie C, Didier N, Faye A, Gil S, Dauge MC, et al. Increased expression of MDR1 mRNAs and P-glycoprotein in placentas from HIV-1 infected women. *Placenta*. 2006;27(6-7):699-706.
 28. Mamede JA, Oliveira-Filho RM, Simões MJ, Mora OA, Espiridião Skulay L Jr. Hepatic and renal effects of azidothymidine and acyclovir on pregnant rats. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 2000;27(3-4):227-30.
 29. Barreto RL, de Jesus Simões M, Amed AM, Soares Júnior JM, Oliveira-Filho RM, Kulay L Jr. Stavudine effects on rat pregnancy outcome. *J Obstet Gynaecol Res*. 2004;30(3):242-5.
 30. Mota DR, Simões MJ, Amed AM, Carvalho AM, Oliveira-Filho RM, Kulay Júnior L. Efeitos do uso crônico do amprenavir sobre a prenhez da rata albina. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2004;26(3):207-11.
 31. Pontes RD, Amed AM, Simões RS, Oliveira-Filho RM, Simões MJ, Kulay L Jr. A morphological and biochemical appraisal of the liver and renal effects of lamivudine on rat pregnancy. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 2006;33(4):209-12.
 32. Quintino MP, Simões RS, Oliveira FH, Oliveira-Filho RM, Simões MJ, Nakamura MU, et al. Morphological and biochemical appraisal of the liver and renal effects of indinavir on rat pregnancy. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 2007;34(4):232-5.
 33. 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.
 34. Marzolini C, Rudin C, Decosterd LA, Telenti A, Schreyer A, Biollaz J, et al. Transplacental passage of protease inhibitors at delivery. *AIDS*. 2002;16(6):889-93.
 35. Novotna M, Libra A, Kopecky M, Pavek P, Fendrich Z, Semecky V, et al. P-glycoprotein expression and distribution in the rat placenta during pregnancy. *Reprod Toxicol*. 2004;18(6):785-92.