

Alexandre Braga Libório

Rosiglitazona, agonista do PPAR- $\gamma$  “Peroxisome  
Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$ ”, reverte a  
nefrotoxicidade induzida pelo Tenofovir-DF.

**São Paulo**

**2008**

Alexandre Braga Libório

Rosiglitazona, agonista do PPAR- $\gamma$  “Peroxisome  
Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$ ”, reverte a  
nefrotoxicidade induzida pelo Tenofovir-DF.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina  
da Universidade de São Paulo para  
obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Nefrologia

Orientador: Dr Antonio Carlos Seguro

**São Paulo**

**2008**

Esse trabalho foi realizado no LIM 12 da Faculdade de  
Medicina da USP, com suporte de bolsa científica do  
CNPq.

# Agradecimientos

## Agradecimento à deus

Vida e misericórdia me concedeste; e o teu cuidado guardou meu espírito.

Jó 10,12

## Agradecimento à família

À minha mãe que me ensinou o caminho do conhecimento e do estudo como forma de conhecer a vida. Sempre me apoiando em momentos e decisões difíceis da vida.

Ao meu pai que se foi logo no início da minha vida acadêmica, mas com a certeza de sua presença em todos os momentos, enfrento as dificuldades e tento vencer cada etapa na minha vida.

Ao meu avô Jader, exemplo de homem.

À minha tia Sônia, que sempre me amou e me tratou como a um filho.

Aos meus irmãos que sempre entenderam minhas ausências como busca por uma coisa maior.

Aos cunhados, sogros, tios, tias e primos que mesmo à distância sempre torceram e rezaram por mim.

### Agradecimento aos amigos

Há amigos que são mais afeiçoados que irmãos.

Agradeço àqueles que não vejo há anos e que se despediram de mim quando estava saindo da faculdade, certos de que tudo passaria logo e em breve nos reencontraríamos.

Agradeço àqueles que encontrei na residência médica, em dias tão difíceis...

### Agradecimento ao LIM 12

Todas as pessoas que fazem o LIM 12 são exemplos de profissionais, mais ainda, são apaixonantes como pessoas. Aprendi e me diverti muito com a Helô, a qual me iniciou nos trabalhos em laboratório. Admiração tive por todos, em especial pela Dra. Lúcia, sempre mostrando que o trabalho é a melhor forma de atingir nossos objetivos.

Uma pessoa especial apareceu na minha caminhada, sempre atrasada mas com um grande sorriso: a Talita foi um grande apoio na segunda fase do meu trabalho, sempre disposta a me auxiliar nas árduas tarefas.

Não posso esquecer o Nivaldo, a Ciça, a Eloá, a Carolzinha e a Fabíola que contribuem para a organização do laboratório.

### Agradecimento ao meu orientador

Admiração é o que sentia por aquele professor que nas suas aulas parecia dominar e unir de forma majestral três áreas que adorava na medicina: fisiologia renal, pesquisa científica e nefrologia clínica. Não tive dúvidas que meu desejo era aprender com ele na pós-graduação. No laboratório, sempre manteve o espírito clínico,

questionador e investigativo, não permitindo que a medicina caia no limbo da mesmice. Dessa fase da minha vida levo esses ensinamentos para minha vida profissional.

## Resumo



LIBÓRIO;A.B. - Rosiglitazona, agonista do PPAR- $\gamma$  “Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$ ”, reverte a nefrotoxicidade induzida pelo Tenofovir-DF. São Paulo, 2008. Tese (Doutorado)- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

**Introdução:** A nefrotoxicidade dos antiretrovirais constituem atualmente fator importante na morbidade e mortalidade de pacientes com HIV. O tenofovir DF (TDF) se enquadra em um dos antiretrovirais mais lesivos ao rim. Conhecer seu mecanismo de nefrotoxicidade e estudar medidas protetoras podem melhorar seu uso clínico.

**Material e Métodos:** Ratos foram tratados durante 30 dias com uma de duas doses de TDF (50 ou 300mg/Kg de dieta), sendo que um grupo teve adicionado em sua dieta maleato de rosiglitazona (RSG) na dose de 92mg/Kg de dieta nos últimos 15 dias. Após esse período, os ratos foram colocados em gaiola metabólica e sacrificados. Foram estudados parâmetros bioquímicos, fluxo sanguíneo renal e os rins extraídos para expressão semiquantitativa dos transportadores epiteliais tubulares.

**Resultados:** Os animais que receberam TDF em dose alta apresentaram insuficiência renal severa acompanhada de redução da expressão da óxido-nítrico sintase endotelial e vasoconstrição renal intensa. Todos esses parâmetros foram parcialmente revertidos pela administração de RSG. Baixas doses de TDF não causou alteração significativa do ritmo de filtração glomerular, porém induziu fosfatúria, acidose tubular proximal, poliúria e redução da capacidade de concentração urinária. Essas alterações foram associadas a redução da expressão de alguns transportadores epiteliais (cotransportador sódio-fosforo, contratransportador sódio-hidrogênio tipo 3

e aquaporina tipo 2). Não foi caracterizado síndrome de Fanconi, pois não houve proteinúria ou glicosúria. O tratamento com RSG reverteu todos os parâmetros de nefrotoxicidade estudados, normalizando as alterações bioquímicas urinárias e a expressão dos transportadores de membrana.

**Conclusões:** Os achados desses experimentos tem potencial aplicação clínica em pacientes com nefrotoxicidade induzida pelo TDF, especialmente naqueles com hipofosfatemia e/ou redução do ritmo de filtração glomerular.

Descritores: 1.Receptores ativados por proliferador de peroxissomo 2.Anti-retrovirais/efeitos adversos 3.Capacidade de concentração renal 4.HIV 5.Ratos 6.Insuficiência renal 7.Distúrbios do metabolismo do fósforo 8.Anormalidades induzidas por drogas

# Abstract



Libório;A.B. – **The Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  Agonist Rosiglitazone Reverses Tenofovir-Induced Nephrotoxicity.** São Paulo, 2008. Tese (Doutorado)- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

**Objective:** To characterize the mechanisms of tenofovir disoproxil fumarate (TDF)-induced nephrotoxicity and the protective effects of rosiglitazone (RSG), a peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  agonist.

**Methods:** Rats were treated for 30 days with one of two TDF doses (50 or 300 mg/kg of food), to which RSG (92 mg/kg of food) was added for the last 15 days. Biochemical parameters were measured, and renal tissue was extracted for immunoblotting.

**Results:** Mean daily ingestion was comparable among all the treated groups. High-dose TDF induced severe renal failure accompanied by reduced expression of endothelial nitric-oxide synthase and intense renal vasoconstriction. All of these features were ameliorated by RSG administration. Low-dose TDF did not alter the glomerular filtration rate but induced significant phosphaturia, proximal tubular acidosis and polyuria, as well as reducing urinary concentrating ability. These alterations were caused by specific downregulation of the sodium-phosphorus cotransporter, sodium/hydrogen exchanger 3 and aquaporin 2. No Fanconi's syndrome was identified (proteinuria was normal and there was no glycosuria). Treatment with RSG reversed TDF-induced tubular nephrotoxicity, normalizing urinary biochemical parameters and membrane transporter protein expression.

**Conclusion:** These findings have potential clinical applications in patients presenting with TFV-induced nephrotoxicity, especially in those presenting with hypophosphatemia or a reduction in glomerular filtration rate.

Keywords: 1. Peroxisome proliferators activated receptor 2. Antiretroviral/adverse effects 3. Renal concentration ability 4. HIV 5. Rats 6. Renal failure 7. Phosphate metabolism disturbs 8. Drug induced abnormalities

<b>1. Introdução.....</b>	<b>17</b>
<b>1.1 Estrutura Molecular e Farmacocinética do Tenofovir Disoproxil Fumarato.....</b>	<b>18</b>
<b>1.2 Aplicações Clínicas do Tenofovir DF.....</b>	<b>20</b>
<b>1.3 Efeitos Renais do Tenofovir DF.....</b>	<b>21</b>
<b>1.4 Estrutura e Função do “Peroxisome Proliferator-Activated Receptor”.....</b>	<b>23</b>
<b>1.5 Efeitos Renais do PPAR-<math>\gamma</math>.....</b>	<b>24</b>
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>26</b>
<b>3. Materiais e Métodos.....</b>	<b>28</b>
<b>3.1 Animais.....</b>	<b>29</b>
<b>3.2 Protocolo dos experimentos.....</b>	<b>29</b>
<b>3.3 Experimentos da Gaiola Metabólica e de Função Renal.....</b>	<b>31</b>
<b>3.4 Análise das Amostras de Sangue e Urina.....</b>	<b>31</b>
<b>3.5 Extração das Proteínas de Membrana.....</b>	<b>32</b>
<b>3.6 Preparação das Amostras Renais para Análise da Expressão Protéica de eNOS.....</b>	<b>33</b>
<b>3.7 Eletroforese de Proteínas e Immunoblotting.....</b>	<b>33</b>
<b>3.8 Semiquantificação das Proteínas Extraídas.....</b>	<b>34</b>
<b>3.9 Análise Estatística.....</b>	<b>34</b>

<b>4.Resultados.....</b>	<b>36</b>
<b>4.1 TDF em Altas Doses Reduz o Ritmo de Filtração</b>	
<b>Glomerular associado à Redução da Expressão da eNOS.....</b>	<b>37</b>
<b>4.2 RSG melhora a Função Renal e a Restaura a Expressão da eNOS em Ratos</b> <b>Tratados com Doses Elevadas de TDF.....</b>	<b>40</b>
<b>4.3 Disfunção Tubular Associada ao uso de TDF em Doses Baixas.....</b>	<b>41</b>
<b>4.4 O cotransportador NaPi-IIa mostra-se reduzido em ratos</b> <b>tratados com TDF em baixas doses.....</b>	<b>43</b>
<b>4.5 Tratamento com TDF em baixa dose está associado à acidose</b> <b>tubular renal e redução da expressão do NHE3.....</b>	<b>45</b>
<b>4.6 TDF não altera a expressão do <math>\alpha</math>-ENaC no córtex renal.....</b>	<b>46</b>
<b>4.7 O NKCC2 tem sua expressão protéica aumentada no grupo</b> <b>TDF baixa dose.....</b>	<b>47</b>
<b>4.8 A expressão de AQP2 está alterada em ratos tratados com TDF.....</b>	<b>47</b>
<b>4.9 Uso de RSG está associado à normalização do cotransportador</b> <b>NaPi-IIa em ratos previamente tratados com TDF.....</b>	<b>50</b>



<b>4.10 A melhora da acidose metabólica induzida pelo TDF e a restauração da expressão do NHE3 está associada ao uso de RSG.....</b>	<b>50</b>
<b>4.11 A expressão protéica do <math>\alpha</math>-ENaC encontra-se aumentada em animais tratados com TDF e RSG.....</b>	<b>50</b>
<b>4.12 A expressão protéica do NKCC2 está aumentada em animais tratados com TDF e RSG.....</b>	<b>51</b>
<b>4.13 A expressão de AQP2 é aumentada em animais tratados com TDF e RSG.....</b>	<b>51</b>
<b>5. Discussão.....</b>	<b>52</b>
<b>5.1 A queda da filtração glomerular induzida pelo TDF é dose dependente e associada a uma redução da expressão da eNOS.....</b>	<b>53</b>
<b>5.2 RSG reverte a redução da eNOS e melhora a disfunção renal induzida pelo TDF.....</b>	<b>54</b>
<b>5.3 A lesão tubular proximal induzida pelo TDF mostrou ser limitada aos transportadores de sódio.....</b>	<b>55</b>
<b>5.4 A toxicidade tubular do TDF não é restrita ao túbulo proximal.....</b>	<b>57</b>
<b>5.5 O tratamento com RSG reverte a toxicidade tubular induzida pelo TDF.....</b>	<b>58</b>
<b>6. Conclusões.....</b>	<b>60</b>
<b>7. Referências.....</b>	<b>63</b>

# 1. Introdução

Com o advento do esquema tríplice do tratamento antiretro-viral, houve um claro aumento da sobrevivência dos pacientes com AIDS, entretanto assistimos também ao surgimento de novas complicações, devido tanto a maior expectativa de vida desses pacientes quanto à exposição a um grande número de drogas.

Entre os efeitos colaterais mais frequentes, está a nefrotoxicidade de drogas, não somente antiretrovirais (indinavir) como outras drogas usadas na profilaxia e tratamento de infecções oportunistas (anfotericina, sulfametoxazol-trimetoprim). Frente a esses fatores, há uma incidência considerável de insuficiência renal mesmo em pacientes estáveis, acompanhados em ambulatório.[1]

Recentemente, uma nova droga está disponível para o tratamento dos pacientes com SIDA – Tenofovir Disoproxil Fumarato (TDF). Entretanto, estudos em animais e humanos têm demonstrado potencial nefrotóxico. O conhecimento da fisiopatologia e a descoberta de ações protetoras podem diminuir a morbi/mortalidade desses pacientes.

### **1.1 Estrutura Molecular e Farmacocinética do Tenofovir Disoproxil Fumarato.**

O TDF é uma pró-droga oral rapidamente convertida em tenofovir após sua absorção. Apesar de ser um potente antiviral e ter uma longa meia-vida intracelular, o tenofovir possui biodisponibilidade limitada após a administração oral. Com a adição de dois radicais ésteres alcalinos (tenofovir DF), houve um aumento de sua lipossolubilidade e absorção intestinal, permitindo sua administração oral.[2]

Logo após absorção intestinal, o tenofovir DF sofre a retirada dos dois radicais ésteres, dando origem ao tenofovir. Em seguida, o tenofovir sofre duas reações de fosforilação intracelular (mediada por uma cinase nucleotídea – adenilato cinase), transformando-se em sua forma ativa (tenofovir difosfato).[3]

Em sua forma ativa, o TDF é um análogo nucleotídeo que atua tanto em células ativas quanto em repouso.[4] Essa propriedade permite que o TDF iniba a replicação viral do HIV em macrófagos e outras células que não estejam sofrendo divisão celular, fato que não ocorre com os análogos nucleosídeos (zidovudina, estavudina...).

O tenofovir compete com o substrato natural deoxiadenosina 5'-trifosfato pela incorporação no DNA durante a transcrição do HIV. Após sua incorporação no DNA, o tenofovir bloqueia a ação da transcriptase reversa do HIV, encerrando o alongamento do DNA viral.[4]

Devido à semelhança estrutural do TDF com outros análogos nucleotídeos (cidofovir, adefovir), que são reconhecidamente nefrotóxicos, ainda há uma preocupação sobre a segurança do TDF quanto a sua toxicidade renal. Estudos mostram que o TDF tem um efeito tóxico menor que outros análogos nucleotídeos sobre células de túbulo proximal em cultura. Entretanto, outros estudos têm demonstrado toxicidade renal em animais em doses supra-terapêuticas, além de relatos de diversos tipos de lesão renal em humanos, como discutido adiante.

Após administração oral, o TDF atinge sua concentração plasmática máxima em torno de 1 hora, apresentando meia-vida plasmática média de 17 horas. Apesar de uma meia-vida plasmática menor, sua concentração intracelular é mais prolongada, atingindo uma meia-vida superior a 60h. Essas características permitem que o TDF seja administrado via oral em dose única diária.

Estudos com doses progressivas de TDF (75, 150, 300 ou 600mg/dia) mostraram que a supressão viral é progressiva até a dose de 300mg/dia, não se observando efeitos aditivos com doses de 600mg. Com os resultados desses estudos, dose diária de 300mg é preconizada em adultos, sem sugestão de correção da dose pelo peso corpóreo.

A excreção do TDF é realizada totalmente pelo rim através da filtração e secreção tubular, sendo eliminado em sua forma inalterada na urina. O TDF não sofre metabolismo ou excreção hepática. Aumento do intervalo entre as doses é sugerido quando o clearance de creatinina é inferior a 50ml/min.

## **1.2. Aplicações Clínicas do Tenofovir DF.**

Em Outubro de 2001, o TDF foi aprovado pelo FDA para uso em pacientes com infecção pelo HIV em associação com outros antiretrovirais. Com estudos posteriores, foi expandido seu uso tanto para pacientes virgens de tratamento para o HIV como para aqueles que já tivessem sido submetidos a outros antiretrovirais.[5-7]

Há algum tempo, os consensos americanos anuais sobre tratamento antiretroviral recomendam iniciar o tratamento com combinação de três drogas, sendo duas desses análogos nucleosídeos (ou nucleotídeos) e em casos excepcionais pode-se usar três análogos nucleosídeos. No consenso mais recente, a associação de dois análogos nucleosídeos (ou nucleotídeos) deve ser: tenofovir DF + emtricitabina/lamivudina, zidovudina + lamivudina/emtricitabina ou emtricitabina + didanosina.[8]

Essas recomendações devem aumentar substancialmente o número de pacientes expostos ao tenofovir DF, aumentando o número de casos relacionados à nefrotoxicidade. A necessidade de uso contínuo e prolongado das drogas antiretrovirais aumenta a importância do conhecimento fisiopatológico de seus efeitos adversos, assim como a busca de fatores de risco e meios de diminuir a sua toxicidade.

Com o uso da lamivudina para o tratamento da hepatite B crônica, o número de cepas do vírus B resistente a lamivudina tem sido cada vez mais descrito.[9] Em estudos recentes, o tenofovir DF tem-se mostrado também uma alternativa para cepas resistentes à lamivudina.[10-12] Esse efeito também deve aumentar o seu uso em pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite B.

### **1.3 Efeitos Renais do Tenofovir DF.**

Como visto anteriormente, apesar da semelhança estrutural com outros análogos nucleotídeos que são reconhecidamente nefrotóxicos, o tenofovir mostrou toxicidade mínima em estudos com cultura de células tubulares.[13]

Estudos *in vivo* em animais mostram que o tenofovir pode causar nefrotoxicidade quando administrado em altas doses.[14] Aumento dos níveis séricos de creatinina, uréia, glicosúria não-hiperglicêmica, proteinúria, fosfatúria e/ou calciúria foram observados em quatro espécies animais (entre elas, ratos) quando expostos à doses 2-20 vezes maiores que a preconizada a humanos.[14]

Estudos de farmacocinética determinaram que o tenofovir é completamente eliminado pelos rins em sua forma inalterada. Com clearance renal superior ao clearance de creatinina, o tenofovir é eliminado tanto por filtração glomerular quanto por secreção tubular.[15]

Apesar de pouco estudado, o mecanismo de secreção tubular do tenofovir ocorre nas células tubulares proximais através do sistema de transporte de ânions orgânicos, envolvendo transportadores específicos nas partes basal e apical das células tubulares.

De maneira semelhante a outros análogos nucleotídeos, o tenofovir é captado pelas células tubulares proximais através do transportador aniônico (hOAT1)

sofrendo acúmulo intracelular. Na parte apical, o tenofovir sofre eliminação para a luz tubular através de um transportador ainda pouco caracterizado. Estudo recente contribuiu para melhor caracterização desse transportador (Renal-Specific Transporter – RST).[16] A susceptibilidade renal ao efeito citotóxico dos análogos nucleotídeos estaria relacionada a maior expressão do hOAT1.[17] O acúmulo do tenofovir nas células tubulares proximais causaria desde disfunção tubular funcional até necrose tubular.

Análise de estudos clínicos prospectivos, assim como análises retrospectivas não mostraram aumento da incidência de insuficiência renal, hipofosfatemia ou proteinúria naqueles pacientes em uso de tenofovir em comparação com pacientes em esquema antiretroviral que não estavam em uso de tenofovir.[18, 19]

Esses estudos não demonstram uma maior incidência de alterações renais em pacientes recebendo tenofovir e sugerem que as alterações surgidas são decorrentes do alto risco desses pacientes: infecção pelo HIV, infecções oportunistas, uso de outras drogas nefrotóxicas. Entretanto, desde 2002 surgiram vários relatos associando o uso de tenofovir à insuficiência renal aguda, disfunção tubular proximal (glicosúria renal, fosfatúria, hipocalemia, proteinúria), acidose metabólica e um relato de diabetes insipidus nefrogênico que reverteu após a suspensão do tenofovir.[20-24]

Apesar dos dados em literatura sugerirem que a nefrotoxicidade ao tenofovir ocorre em baixa frequência, sua etiologia é confirmada tanto por estudos experimentais como pelos vários relatos de casos em humanos. A equipe da Unidade de Terapia Intensiva do Hospital Emílio Ribas também observou dois casos de insuficiência renal com sinais de tubulopatia proximal (hipocalemia, hipofosfatemia...) associados ao uso de tenofovir em nosso meio (comunicação pessoal).

Devido ao aumento das indicações do uso do tenofovir no tratamento da infecção pelo HIV, transformando-se em opção para o esquema antiretroviral inicial, além de possíveis indicações para o tratamento da hepatite crônica pelo vírus B, deve haver um grande aumento do número de casos de nefrotoxicidade associado a essa droga. Alguns fatores de risco já foram identificados em estudos clínicos (disfunção renal prévia, baixo peso corpóreo e uso concomitante de ritonavir – causa aumento de 30% no nível sérico do tenofovir, além de inibir o transportador apical RST). São escassos os estudos que avaliem outros fatores de risco para ocorrência da nefrotoxicidade, assim como um melhor entendimento da sua fisiopatologia e descobertas de agentes que possam diminuir esse risco e permitir uma exposição segura dos pacientes à droga.

#### **1.4 Estrutura e Função do “Peroxisome Proliferator-Activated Receptor”**

“Peroxisomal proliferator-activated receptors” (PPAR) são receptores nucleares que quando estimulados ativam fatores de transcrição variados, que terminam por exercer diferentes efeitos fenotípicos, de acordo com o tecido em que se encontram expressos. Fazem parte de uma grande família de receptores nucleares que inclui os receptores glicocorticóides, tireoidianos, e retinóides.[25]

PPAR foi descrito inicialmente por Issemam e Green em material hepático, sendo identificado desde então três subtipos: alfa ( $\alpha$ ), Beta/delta e gama ( $\gamma$ ). Desses, apenas dois ( $\alpha$  e  $\gamma$ ) tem papel estabelecido.

Expresso em vários tecidos (fígado, células adiposas, músculo, rim...), exercem funções diversas: causam alterações no metabolismo lipídico, participam da adipogênese, aumentam a sensibilidade à insulina, aumentam a  $\beta$ -oxidação,



participam do ciclo celular...).[25] Entretanto, o completo entendimento de seu papel ainda está longe de ser alcançado e é sujeito de muitas pesquisas.

Os ativadores naturais do PPAR ainda são em parte desconhecidos, porém incluem ácidos graxos e outros produtos do metabolismo lipídico.[26] Agonistas PPAR não-naturais foram identificados e são usados na prática clínica atual. Os fibratos são agentes comumente usados no tratamento da dislipidemia e se mostraram agonistas do PPAR- $\alpha$ , enquanto as glitazonas, classe usada no tratamento do diabetes mellitus II, é um forte agonista PPAR- $\gamma$ .

### **1.5 Efeitos Renais do PPAR- $\gamma$**

O PPAR- $\gamma$  foi estudado inicialmente por ser expresso no tecido adiposo e sua função estar associada à resistência insulínica, levando ao desenvolvimento de uma nova classe de drogas para o tratamento do diabetes mellitus tipo 2, as glitazonas. Essas são agonistas do PPAR- $\gamma$ , melhorando a sensibilidade insulínica, diminuindo o ganho de peso e melhorando outras alterações da síndrome metabólica.

O PPAR- $\gamma$  também está expresso em tecido renal, porém com localização e ações diversas do PPAR- $\alpha$ . Foi encontrado principalmente na microvasculatura renal, células mesangiais, túbulo proximal e coletor.[27]

As ações do PPAR- $\gamma$  são diversas e dependem do local onde está expresso. Inicialmente, foi verificado que em ratos Zucker diabéticos, o agonista PPAR- $\gamma$  foi capaz de diminuir a hiperfiltração glomerular, a excreção de albumina, a expansão mesangial e a expressão do TGF- $\beta$ . [28, 29]

Ma et al.[30] mostraram que o agonista PPAR- $\gamma$  rosiglitazone diminui a progressão da insuficiência renal crônica em modelo renal de ablação 5/6, mostrando que sua ação intermedeia a produção de vários mediadores inflamatórios e age

também na proliferação celular. Nesse estudo, houve uma atenuação da queda da filtração glomerular associada a uma diminuição da hipertrofia e proliferação celular, quantificada por imunohistoquímica para p27 e PCNA, respectivamente. Alterações inflamatórias também foram diminuídas pela ativação do PPAR- $\gamma$ , com diminuição do infiltrado de macrófagos e da expressão de TGF- $\beta$ .

Song et al.[31] estudaram os efeitos tubulares da rosiglitazone em ratos e verificaram que houve um aumento da expressão da Npt2, da sub-unidade  $\alpha$ 1 da Na-K-ATPase, NKCC2 e da NHE3. Houve uma diminuição da excreção de água e sódio. Outro dado desse estudo foi a queda da pressão arterial e diminuição do clearance de creatinina. Esses dados corroboram a ação do agonista PPAR- $\gamma$  em vasos, associando-se a um aumento da expressão da óxido nítrico-sintetase (NOS). Apesar de ter apresentado um efeito maléfico em ratos normais, com piora da função renal, esse aumento da NOS pode ter efeito benéfico em situações associadas a uma vasoconstrição renal.

## 2. Objetivos

- Estudar os mecanismos da nefrotoxicidade induzida pelo Tenofovir DF.
- Avaliar o efeito protetor do Maleato de Rosiglitazona (agonista do PPAR- $\gamma$ ) na nefrotoxicidade induzida pelo Tenofovir DF.

### 3. Materiais e Métodos

### 3.1 Animais

Para os experimentos do estudo, foram utilizados ratos Wistar machos, com peso corpóreo entre 200 e 230g, obtidos a partir do biotério central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Esses animais foram submetidos à dosagem de uréia plasmática após jejum de 24 horas através de método espectrofotométrico, sendo excluídos aqueles com uréia superior à 50 mg/dL.

Os animais selecionados foram mantidos em gaiolas com livre acesso à água e em condições similares de temperatura e iluminação. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

### 3.2 Protocolo dos Experimentos

Foram realizadas três séries de experimentos:

- Primeira série (TDF em alta dose): Essa série envolveu três grupos de animais, a saber:
  - Grupo controle (n=4): animais foram alimentados com dieta padrão durante 30 dias.
  - Grupo TDF alta dose (n=5): animais foram alimentados com dieta padrão acrescida de TDF na dosagem de 300mg/Kg de dieta durante 30 dias.
  - Grupo TDF alta dose + RSG (n=5): animais foram alimentados com dieta padrão acrescida de TDF na dosagem de 300mg/Kg de dieta durante 15 dias e com dieta padrão acrescida de TDF na dosagem de 300mg/Kg e RSG na dosagem de 92mg/Kg pelos 15 dias subseqüentes.

- Segunda série (TDF em baixa dose): Essa série também envolveu três grupos de animais, a saber:
  - Grupo controle (n=4): animais foram alimentados com dieta padrão durante 30 dias.
  - Grupo TDF baixa dose (n=6): animais foram alimentados com dieta padrão acrescida de TDF na dosagem de 50mg/Kg de dieta durante 30 dias.
  - Grupo TDF baixa dose + RSG (n=5): animais foram alimentados com dieta padrão acrescida de TDF na dosagem de 50mg/Kg de dieta durante 15 dias e com dieta padrão acrescida de TDF na dosagem de 50mg/Kg e RSG na dosagem de 92mg/Kg pelos 15 dias subseqüentes.
  
- Terceira série de experimentos (RSG isolada): Essa série envolveu dois grupos de animais, a saber:
  - Grupo controle (n=6): animais foram alimentados com dieta padrão durante 15 dias.
  - Grupo RSG (n=5): animais foram alimentados com dieta padrão acrescida de RSG na dosagem de 92mg/Kg durante 15 dias.

A dosagem utilizada de Tenofovir DF (300 mg/Kg) e Rosiglitazona foram baseadas em estudos prévios [31,32], enquanto a baixa dosagem de Tenofovir DF foi escolhida de forma empírica baseada nos experimentos com o grupo TDF alta dose.

### **3.3 Experimentos da Gaiola Metabólica e de Função Renal**

Os animais foram colocados em gaiolas metabólicas individuais, mantidos em ciclos de 12h (dia e noite) e com acesso livre à água. Os ratos foram aclimatados às condições da gaiola metabólica um dia antes dos procedimentos experimentais (coleta de urina de 24h). Esses experimentos foram feitos no 30º dia na primeira e segunda séries de experimentos e no 15º dia na terceira série de experimentos.

Após o último dia na gaiola metabólica, os animais da primeira e segunda série de experimentos (TDF em alta e baixa dose) foram anestesiados com injeção intra-peritoneal de pentobarbital sódico (50mg/Kg de peso corpóreo) e colocados em uma mesa cirúrgica com controle de temperatura. Foi realizada traqueostomia e um cateter PE50 foi inserido na artéria femoral esquerda para mensuração da pressão arterial sistêmica média. Um probe medidor de fluxo ultrasônico (T-106, Transsonic Systems Inc., Ithaca, NY, USA) foi locado na artéria renal esquerda a fim de monitorar o fluxo sanguíneo renal. Amostras de sangue foram colhidas e os animais foram sacrificados com uma dose letal de pentobarbital sódico. Os animais da terceira série de experimentos tiveram sangue coletado após a permanência na gaiola metabólica e foram sacrificados.

### **3.4 Análise das Amostras de Sangue e Urina**

As amostras de urina de 24h foram medidas gravitacionalmente e posteriormente centrifugadas em alíquotas para remover o material suspenso e o sobrenadante foi usado para análise. O sangue foi colhido com seringa heparinizada e centrifugado e o plasma separado. Osmolalidade urinária e plasmática foram medidas com um osmômetro de pressão de vapor (5520; Wescor, Logan, UT, USA). Os níveis urinários e plasmáticos de sódio e potássio foram mensurados por fotometria de



chama. Os níveis de fósforo urinário e plasmático foram mensurados pelo método de moblidato. Um ensaio colorimétrico (Labtest, Lagoa Santa, Brasil) foi utilizado para quantificar as concentrações urinárias e plasmáticas de glicose, proteína, magnésio e creatinina. O clearance de creatinina (em mL/min/100g de peso corpóreo) foi calculado pela seguinte fórmula:  $\text{Creatinina urinaria} \times [\text{volume urinário (mL)} / \text{tempo (1440 min)}] / \text{creatinina sérica}$ . O pH urinário também foi medido (MP225 pHmetro; Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland).

### **3.5 Extração das Proteínas de Membrana**

Os rins dos animais foram dissecados para separar o córtex da medula renal. Amostras do córtex e medula foram homogeneizadas em uma solução gelada (200mmol/L de manitol, 80mmol/L de HEPES, 41mmol/L de KOH, pH de 7.5) contendo um coquetel de inibidor de protease (Cocktail Protease Inhibitor, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) usando um pistilo de teflon (Schmidt and Co., Frankfurt/M, Germany). Os homogeneizados foram centrifugados a baixa velocidade (3000g) por 15 minutos à 4° C para remover núcleos e debris celulares. Em seguida, o sobrenadante foi centrifugado na velocidade de 100.000g por 1h à 4° C (70 Ti rotor, Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) para produzir um *pellet* contendo frações de membrana enriquecidas com membranas plasmáticas e vesículas intracelulares. Esses *pellets* foram suspensos em solução contendo inibidores de protease.

As concentrações protéicas foram medidas pelo método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay kit; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

### 3.6 Preparação das Amostras Renais para Análise da Expressão Protéica da eNOS

Amostras de rim total foram homogeneizadas em uma solução gelada (200mmol/L de manitol, 80mmol/L de HEPES, 41mmol/L de KOH, pH de 7.5) contendo um coquetel de inibidor de protease (Cocktail Protease Inhibitor, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) usando um pistilo de teflon (Schmidt and Co., Frankfurt/M, Germany). Os homogeneizados foram centrifugados a baixa velocidade (3000g) por 15 minutos à 4° C para remover núcleos e debris celulares. Os *pellets* foram suspensos em solução contendo inibidores de protease.

As concentrações protéicas foram medidas pelo método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay kit; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

### 3.7 Eletroforese de Proteínas e *Immunoblotting*

As amostras de proteína de membrana correram em minigel de poliacrilamida: gel a 12,5% para aquaporina 2; 10% para cotransportador sódio-fósforo IIa (NaPiIIa), contratransportador sódio-hidrogênio tipo 3 (NHE3) e para a subunidade alfa do canal epitelial de sódio ( $\alpha$ -ENaC); 8% para o cotransportador sódio-potássio-cloro (NKCC2). Após eletrotransferência para as membranas de nitrocelulose (PolyScreen, PVDF Transfer; Life Science Products, Boston, MA, USA), foi realizado bloqueio das membranas durante 1h com solução de leite a 5% e Tween 20 a 0.1% em solução tamponada de fosfato (NaCl 8.7g/L, fosfato dibásico 7.2mmol/L e fosfato monobásico 2.8mmol/L). As membranas foram então incubadas com um dos seguintes anticorpos a depender do transportador estudado: anti-AQP2 (1:2000), anti-NHE3 (1:500), anti- $\alpha$ -ENaC (1:1000), anti-NKCC2 (0.12 $\mu$ g/mL) ou anti-NaPiIIa (0.54 $\mu$ g/mL). A marcação foi feita através da peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody (anti-

rabbit 1:2000, anti-mouse 1:2000 ou anti-goat 1:10000, Sigma) usando sistema de quimiluminescência (ECL, Amersham). Os anticorpos policlonais específicos para o NKCC2, NHE3, e NaPiIIa foram fornecidos pelo Dr. Mark Knepper (NHLBI/NIH, Bethesda, MD, USA). Os anticorpos específicos para AQP2,  $\alpha$ -ENaC e actin foram obtidos da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA).

Para a avaliação da isoforma eNOS, 100 $\mu$ c de proteína total de cada amostra foi separada em gel de poliacrilamida a 8% e transferida para uma membrana de PVDF. A incubação foi feita com anticorpo anti-eNOS diluído em 1:2000 em TBS e Tween 01%. A marcação foi feita com o anticorpo secundário *anti-mouse HRP* e com o sistema ECL.

Para o controle das amostras protéicas, as membranas foram incubadas com anticorpo anti-actina (1:3000, Santa Cruz Biotechnology). A marcação foi visualizada com o anticorpo secundário conjugado HRP (*anti-goat*, diluído 1:5000; Sigma).

### **3.8 Semiquantificação das Proteínas Extraídas**

As bandas nos filmes de ECL com variação linear foram submetidas ao *scan* Image Master VDS (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), onde foi feita a densitometria. Todas as bandas foram normatizadas pela abundância densitométrica da proteína actina.

### **3.9 Análise Estatística**

Todos as variáveis quantitativas estão expressas como media  $\pm$  erro-padrão. As diferenças entre as médias de múltiplas variáveis foram analisadas pela *one-way* ANOVA seguido pelo test de Student-Newman Keuls ou pelo teste de Tukey. Valores de  $p < 0.05$  foram considerados estatisticamente significativos.

Em todas as três séries de experimentos, os ratos consumiram em média a mesma quantidade de dieta (aproximadamente 23g/dia). Na primeira série de experimentos,

## 4. Resultados

Nas três séries de experimentos, todos os animais tiveram uma ingestão similar de dieta (aproximadamente 23 g/dia). Como pode ser observado nas tabelas 1 e 2, a redução no clearance de creatinina associado ao uso do TDF foi dose-dependente, sendo que apenas no grupo TDF alta dose houve uma redução significativa do clearance de creatinina. Diante desses dados, utilizamos a primeira série de experimentos (TDF em alta dose) para estudarmos filtração glomerular e a segunda série de experimentos (TDF em baixa dose) para avaliação da função tubular.

#### **4.1 TDF em Altas Doses Reduz o Ritmo de Filtração Glomerular associado à Redução da Expressão da eNOS**

Os resultados dos experimentos de medida da função renal (Clearance de creatinina – ClCr) e do fluxo sanguíneo renal (FSR) na série de experimentos com TDF em alta dose estão mostrados na tabela 1. Não houve diferença entre os grupos quanto ao peso corpóreo. Os animais do grupo TDF alta dose apresentaram pressão arterial sistêmica média mais elevada e uma significativa e importante queda no ritmo de filtração glomerular como evidenciado pela redução no ClCr. Essas alterações foram associadas a uma intensa vasoconstrição renal, como mostrado pela redução do FSR e aumento na resistência vascular renal. O grupo TDF alta dose também apresentou uma redução da expressão da eNOS quando comparado ao grupo controle (figura 1).

**Tabela 1:** Função renal e parâmetros hemodinâmicos nos grupos controle, em animais que receberam TDF na dose de 300mg/Kg de dieta durante 30 dias (grupo TDF alta dose) e em ratos tratados por 30 dias com a mesma dose de TDF, tendo também recebido RSG (92mg/Kg de dieta) nos últimos 15 dias (grupo TDF alta dose + RSG).

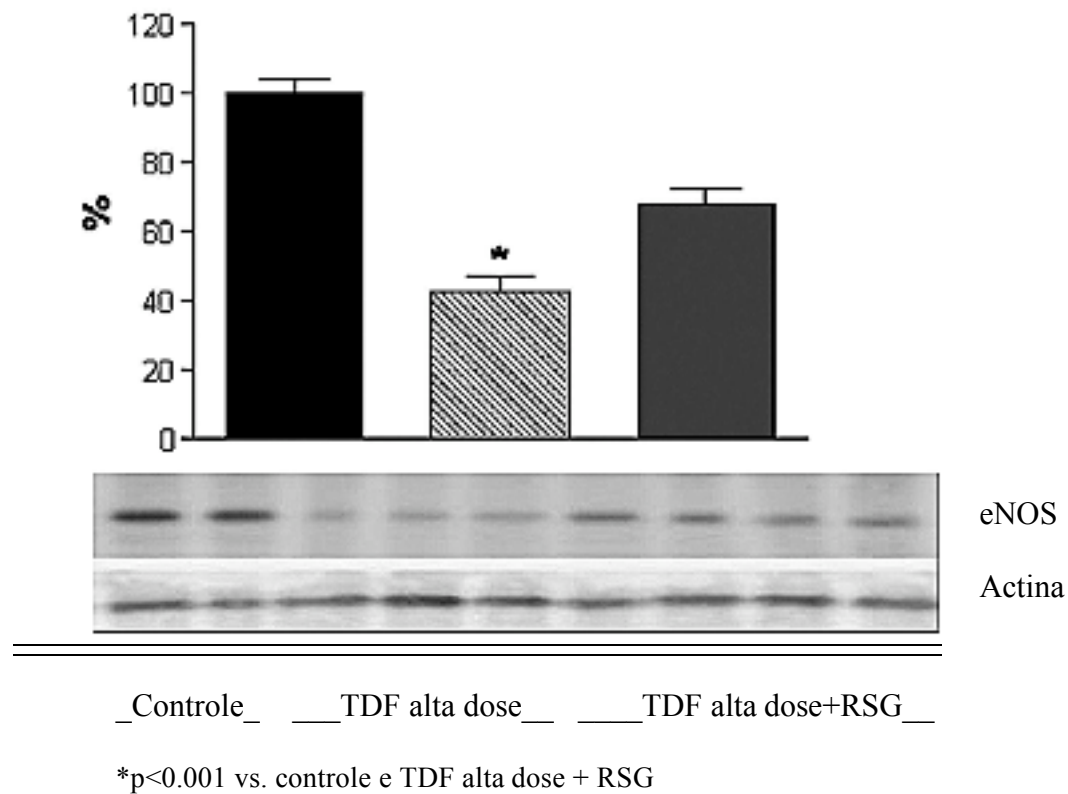
<i>Grupo</i>	<i>PC</i>	<i>Diurese</i>	<i>ClCr</i>	<i>PAM</i>	<i>FSR</i>	<i>RVR</i>
Controle (n=4)	272±18	11.5±1.5	0.83±0.07	117±3.8	6.1±0.15	19.4±0.8
TDF alta dose (n=5)	259±15	13.9±2.1	0.19±0.01 <sup>a</sup>	140±4.2 <sup>b</sup>	2.3±0.20 <sub>c,d</sub>	60.9±1.1 <sup>a</sup>
TDF alta dose + RSG (n=5)	267±8	11.8±1.3	0.58±0.04 <sup>c</sup>	125±3.5	4.3±0.35 <sub>e</sub>	29.7±0.9 <sup>e</sup>

Dados estão expressos como média±SEM

PC, Peso corpóreo; Diurese em mL/dia; ClCr, clearance de creatinina (mL/min/100g); PAM, pressão arterial média (mmHg); FSR, fluxo sanguíneo renal (mL/min); RVR, resistência vascular renal (mmHg/mL/min).

<sup>a</sup>p<0.001 vs. outros grupos; <sup>b</sup>p<0.05 vs. outros grupos; <sup>c</sup>p<0.001 vs. grupo controle; <sup>d</sup>p<0.005 vs. TDF alta dose + RSG; <sup>e</sup>p<0.01 vs. grupo controle pela ANOVA e pós-teste de múltiplas comparações de Tukey.

**Figura 1:** Análise semi-quantitativa da expressão protéica através do *immunoblotting*. (a) Análise densitométrica de todas as mostras dos grupos controle, TDF alta dose e TDF alta dose + RSG. O grupo TDF alta dose apresentou uma diminuição da expressão da óxido-nítrico sintase endotelial (eNOS). Os níveis de eNOS foram completamente restaurados no grupo que recebeu RSG. (b) Bandas que se expressaram com o anti-eNOS.



## 4.2 RSG melhora a Função Renal e a Restaura a Expressão da eNOS em Ratos

### Tratados com Doses Elevadas de TDF

A administração da RSG nos últimos 15 dias de experimentos (grupo TDF alta dose + RSG) foi associado com uma melhora da função renal, expressa pela melhora



no ClCr em relação ao grupo TDF alta dose. Não houve nenhuma diferença estatisticamente significativa no ClCr entre o grupo TDF alta dose +RSG e o grupo controle ( $0.58 \pm 0.03$  vs.  $0.68 \pm 0.05$  mL/min/100g). A vasoconstrição renal foi menos severa no grupo TDF alta dose + RSG quando comparado ao grupo TDF alta dose (tabela 1). Esses dados funcionais se associam ao fato de que o grupo TDF alta dose + RSG não apresentou redução na expressão da eNOS quando comparado com o grupo controle (figura 1).

**Tabela 2:** Função renal e parâmetros hemodinâmicos nos grupos controle, em animais que receberam TDF na dose de 50mg/Kg de dieta durante 30 dias (grupo TDF baixa dose) e em ratos tratados por 30 dias com a mesma dose de TDF, tendo também recebido RSG (92mg/Kg de dieta) nos últimos 15 dias (grupo TDF baixa dose + RSG).

<i>Grupo</i>	<i>PC</i>	<i>Diurese</i>	<i>ClCr</i>	<i>PAM</i>	<i>FSR</i>	<i>RVR</i>
Controle (n=4)	272±18	11.5±1.5	0.83±0.07	117±3.8	6.1±0.15	19.4±0.8
TDF baixa dose (n=6)	274±12	23.4±1 <sup>a</sup>	0.72±0.08	128±3.1	5.0±0.19 <sup>b</sup>	25.6±1.3 <sup>c</sup>
TDF baixa dose + RSG (n=5)	262±6	8.4±1.1	0.74±0.01	117±2.8	5.9±0.35	19.8±0.9

Dados estão expressos como média±SEM

PC, Peso corpóreo; Diurese em mL/dia; ClCr, clearance de creatinina (mL/min/100g); PAM, pressão arterial média (mmHg); FSR, fluxo sanguíneo renal (mL/min); RVR, resistência vascular renal (mmHg/mL/min).

<sup>a</sup>p<0.01 vs. outros grupos; <sup>b</sup>p<0.05 vs. outros grupos; <sup>c</sup>p<0.01 vs. outros pela ANOVA e pós-teste de múltiplas comparações de Tukey.

### **4.3 Disfunção Tubular Associada ao uso de TDF em Doses Baixas**

Em termos de função renal, não houve diferença significativa entre o grupo TDF baixa dose e o grupo controle (tabela 2). No grupo de ratos com TDF em baixa dose, a diurese foi significativamente maior em relação ao grupo controle (tabela 3). Os ratos com TDF em baixa dose também apresentaram marcante redução da osmolalidade urinária em relação aos animais do grupo controle. Em parâmetros que avaliam a função tubular proximal, foi possível verificar alterações em alguns pontos que podem se relacionar à disfunção tubular proximal, tais como aumento da excreção urinária de fósforo e redução do bicarbonato sérico. Entretanto, outros marcadores clássicos de disfunção tubular proximal (glicosúria, proteinúria) não foram verificados.

Não foram observadas diferenças na excreção urinária de sódio e potássio entre os grupo controle e TDF baixa dose. Também nenhuma diferença foi observada entre os grupos controle e TDF baixa dose na excreção urinária de cálcio ou magnésio.

A administração de RSG reverteu a hiperfosfatúria apresentada pelos animais do grupo TDF baixa dose. No grupo TDF baixa dose + RSG, os níveis de fósforo urinário retornaram a níveis semelhantes ao grupo controle ao final de 30 dias (tabela 3). A acidose metabólica apresentada pelos animais no grupo TDF baixa dose não foi visto no grupo que recebeu TDF em baixa dose e RSG assim como o diabetes insipidus nefrogênico parcial verificado ao final de 30 dias de TDF isoladamente não ocorreu no grupo TDF baixa dose + RSG.

No grupo que recebeu RSG isoladamente, os ratos apresentaram aumento importante no peso corpóreo ( $293 \pm 6g$  vs.  $252 \pm 7g$ ,  $p < 0.001$ ), assim como um aumento

na osmolalidade urinária (tabela 4). Entretanto, não houve qualquer diferença no volume urinário ( $26 \pm 3.2$  no grupo controle vs.  $22 \pm 3.1$  mL/dia no grupo RSG,  $p=ns$ ). De forma inesperada, os animais que receberam RSG isoladamente durante 15 dias apresentaram aumento da excreção urinária de sódio, potássio e fósforo (tabela 4).

**Tabela 3:** Parâmetros funcionais em ratos normais (controle), em animais tratados com TDF em baixa dose (50 mg/kg de dieta), e ratos tratados por 30 dias com a mesma dose de TDF, sendo adicionado RSG (92 mg/kg de dieta) no 15<sup>o</sup> (grupo TDF baixa dose+RSG)

	Controle	TDF baixa dose	TDF baixa dose+RSG
Diurese (mL/dia)	$11.5 \pm 0.5$	$23.4 \pm 1.6^a$	$8.4 \pm 1.1$
UOsm (mOsm/kgH <sub>2</sub> O)	$988 \pm 101$	$520 \pm 85^{b,c}$	$1360 \pm 138^c$
U <sub>P</sub> V (μmol/dia)	$316 \pm 33$	$648 \pm 41^a$	$351 \pm 36$
U <sub>Na</sub> V (mEq/dia)	$1.30 \pm 0.22$	$1.45 \pm 0.14$	$1.46 \pm 0.15$
U <sub>K</sub> V (mEq/dia)	$1.16 \pm 0.21$	$1.65 \pm 0.38$	$1.48 \pm 0.18$
U <sub>Mg</sub> V (mg/dia)	$0.96 \pm 0.26$	$0.92 \pm 0.28$	$1.04 \pm 0.13$
U <sub>Ca</sub> V (μg/dia)	$354 \pm 25$	$298 \pm 22$	$362 \pm 32$
Bicarbonato (mEq/L)	$24.6 \pm 1.2$	$18.3 \pm 0.8^d$	$23.7 \pm 1.0$
Ânion gap sérico**	$18.3 \pm 1.8$	$17.9 \pm 2.0$	$18.5 \pm 1.6$

UOsm, Osmolalidade urinária; U<sub>Na</sub>V, sódio urinário; U<sub>K</sub>V, potássio urinário; U<sub>P</sub>V, fósforo urinário; U<sub>Mg</sub>V, magnésio urinário; U<sub>Ca</sub>V, cálcio urinário

<sup>a</sup>*p* < 0.001 vs. controle e TDF baixa dose+RSG; <sup>b</sup>*P* < 0.001 vs. TDF baixa dose+RSG; <sup>c</sup>*P* < 0.05 vs. controle; <sup>d</sup>*P* < 0.05 vs. controle e TDF baixa dose+RSG

\*\*ânion gap calculado pela fórmula sódio-cloro-bicarbonato

**Tabela 4: Parâmetros funcionais em ratos do grupo controle e ratos tratados com RGS por 15 dias (92mg/kg de dieta)**

	PC (g)	Uosm (mOsm/KgH <sub>2</sub> O)	Diurese (mL/dia)	UNaV (mEq/dia)	UKV (mEq/dia)	UPV (µmol/dia)
Grupo controle	252±7	410± 73	26±3.2	0.6± 0.05	1.2± 0.04	524 ± 25
Grupo RSG	293±6 <sup>a</sup>	627±55 <sup>b</sup>	22±3.1	1.48±0.15 <sup>a</sup>	1.4±0.08 <sup>b</sup>	848±35.4 <sup>a</sup>

PC, peso corpóreo; UOsm, osmolalidade urinária; UNaV, sódio urinário; UKV, potássio urinário; UPV, fósforo urinário

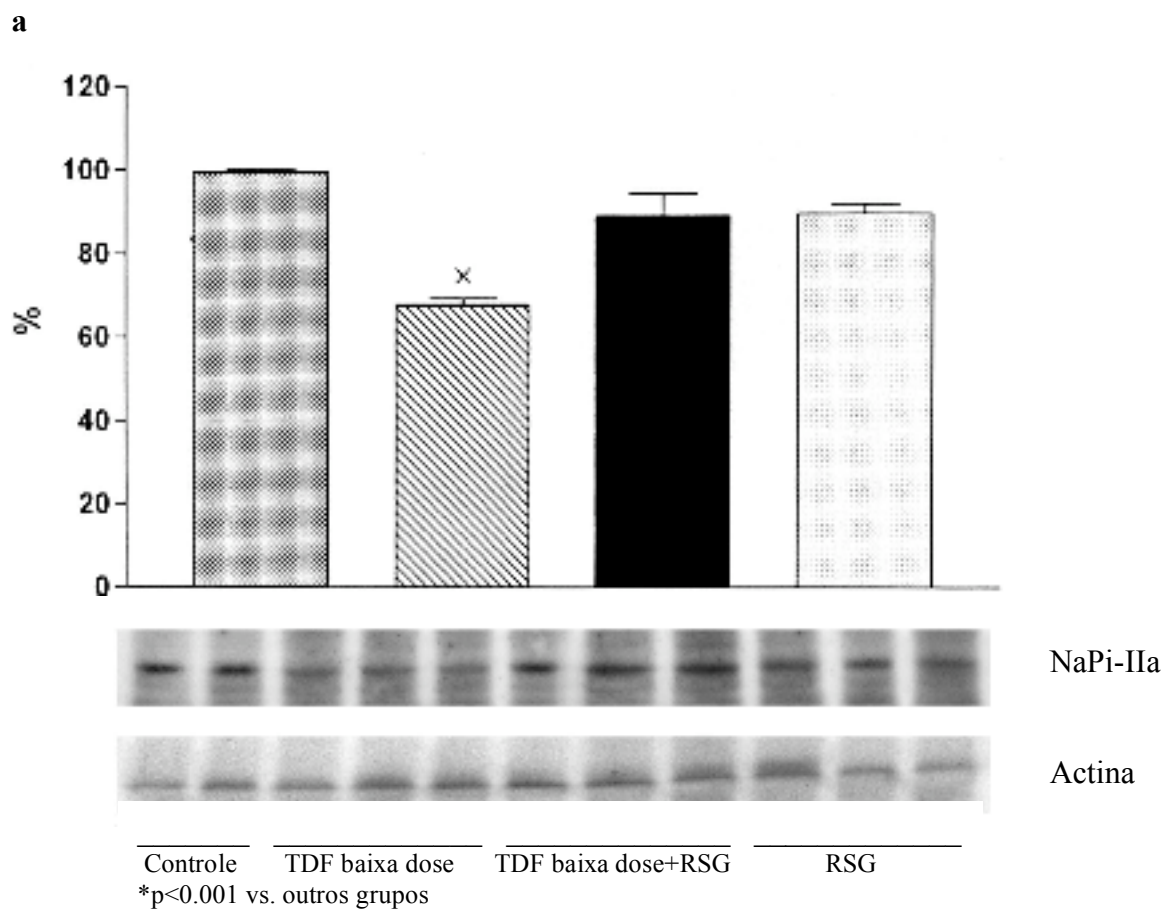
<sup>a</sup>*p*<0.001 vs. controle; <sup>b</sup>*p*<0.005 vs. controle

#### 4.4 O cotransportador NaPi-IIa mostra-se reduzido em ratos tratados com TDF em baixas doses

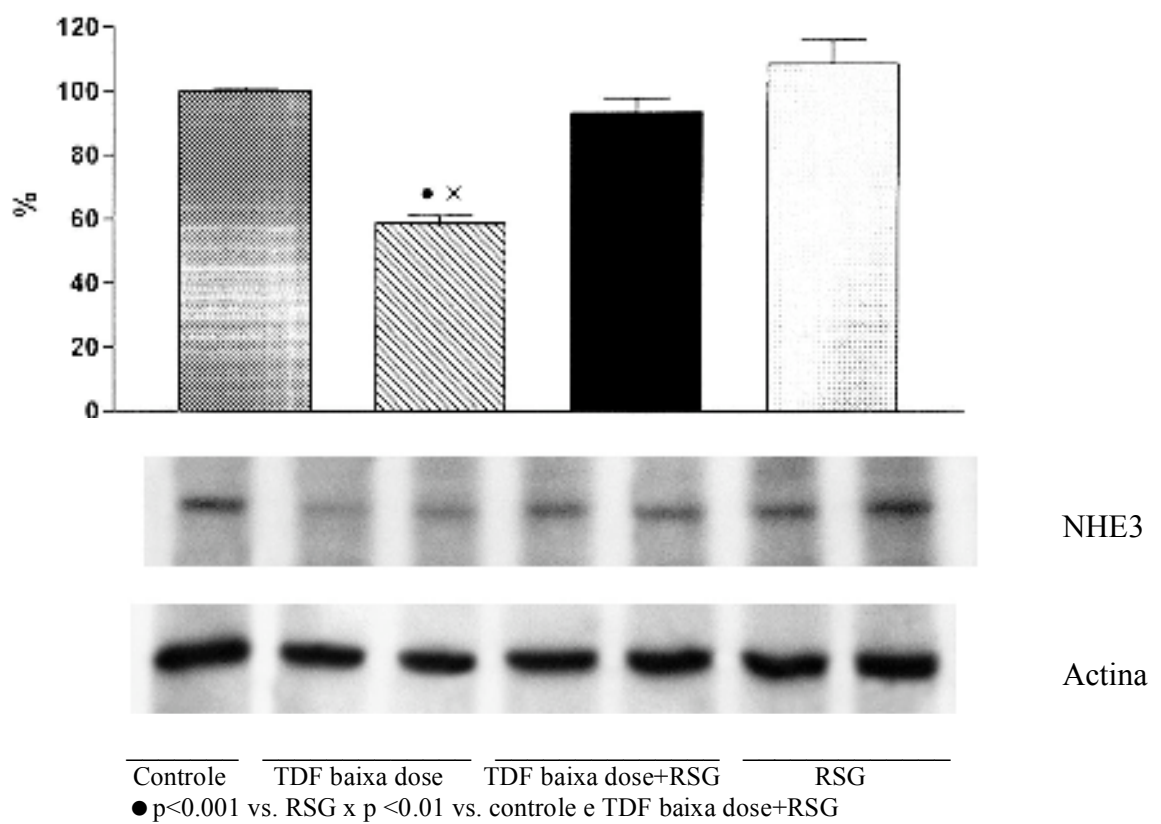
A reabsorção tubular de fósforo é amplamente realizada no túbulo proximal através do cotransportador NaPi-IIa. Para investigar uma possível causa da hiperfosfatúria apresentada pelos animais do grupo TDF baixa dose, foi estudada a expressão desse transportador no córtex renal. Como mostrado na figura 2a, a

expressão protéica do cotransportador NaPi-IIa estava significativamente reduzida quando comparado ao grupo controle ( $67.7 \pm 1.4$  vs.  $99.5 \pm 0.5\%$ ,  $p < 0.01$ ).

**Figura 2:** Análise semiquantitativa das membranas preparadas do corte renal/ Análise densitométrica de todas as amostras dos grupos controle, TDF baixa dose, TDF baixa dose + RSG e RSG. a: Os animais do grupo TDF baixa dose apresentaram diminuição da expressão do cotransportador NaPi-IIa. Os níveis foram restaurados em resposta à RSG. As membranas reagiram com o anticorpo anti-NaPi-IIa, revelando uma banda de 85-kDa. b: O grupo TDF baixa dose apresentou diminuição da expressão do cotransportador NHE3. Os níveis de NHE3 foram restabelecidos com o uso da RSG. as membranas reagiram com o anticorpo anti-NHE3, revelando uma banda de 84kDa.



b.



#### 4.5 Tratamento com TDF em baixa dose está associado à acidose tubular renal e redução da expressão do NHE3

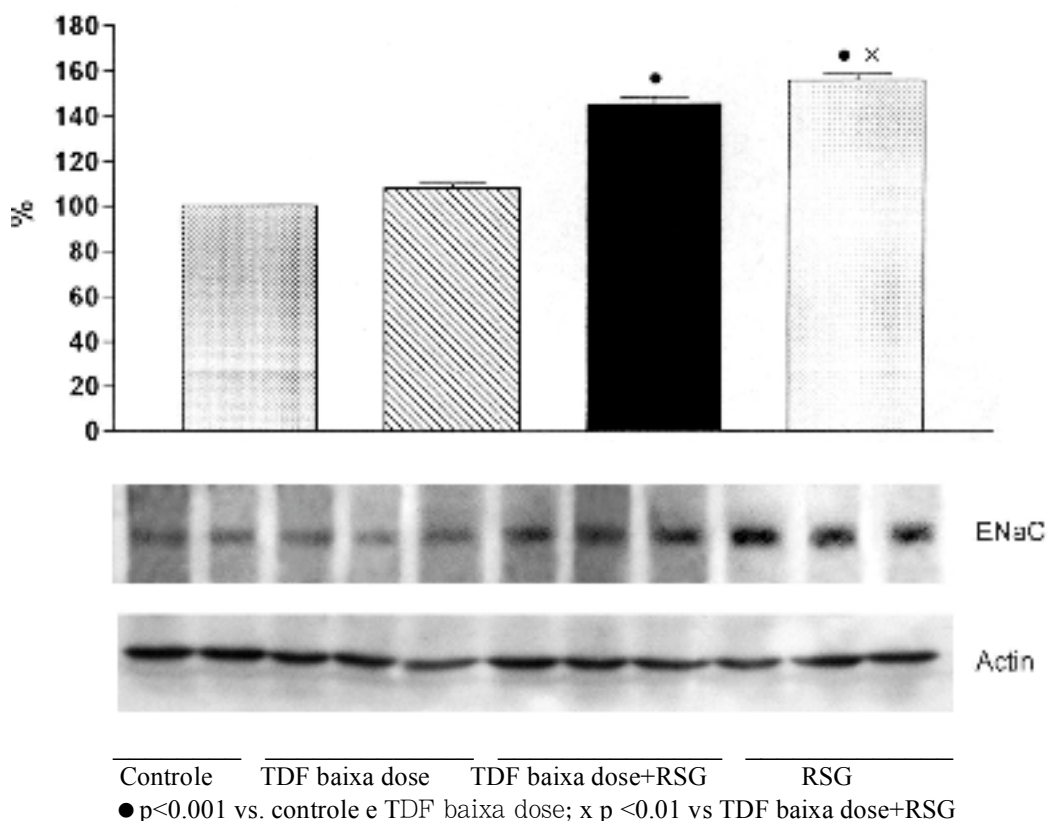
Animais tratados com TDF apresentaram redução no bicarbonato sérico com ânion gap similar ao grupo controle. Entretanto, esses animais mantinham a capacidade de acidificação urinária, sugerindo uma disfunção tubular proximal (tabela

3). No intuito de investigar uma possível causa da acidose metabólica, foi estudada a expressão do contratransportador NHE3. Como visto na figura 2b, os ratos do grupo TDF baixa dose teve uma redução significativa da expressão protéica do NHE3 ( $100 \pm 1$  vs.  $59 \pm 2.1\%$ ,  $p < 0.01$ ). Esse dado é consistente com uma acidose tubular renal tipo II (proximal).

#### **4.6 TDF não altera a expressão do $\alpha$ -ENaC no córtex renal**

A figura 3 mostra a expressão semi-quantitativa de homogeneizados do córtex renal marcados com anticorpo contra o transportador  $\alpha$ -ENaC. A abundancia desse transportador se mostrou inalterada no grupo TDF baixa dose em relação ao grupo controle ( $108.3 \pm 1.7$  no grupo TDF baixa dose vs.  $100\%$  no grupo controle,  $p = ns$ ).

**Figura 3:** Análise semiquantitativa das membranas preparadas do cortex renal. Análise densitométrica de todas as amostras dos grupos controle, TDF baixa dose, TDF baixa dose + RSG e RSG. Os animais do grupo TDF baixa dose apresentaram expressão normal do  $\alpha$ -ENaC, enquanto os níveis desse transportador estavam aumentados em resposta à RSG. As membranas reagiram com o anticorpo anti- $\alpha$ -ENaC, revelando uma banda de 86-kDa.



#### 4.7 O NKCC2 tem sua expressão protéica aumentada no grupo TDF baixa dose

Apesar da expressão protéica do NHE3 estar reduzida no grupo TDF baixa dose e esse transportador ser importante na reabsorção tubular de sódio, nenhuma alteração na excreção urinária de sódio foi observada nesse grupo. Para investigar um possível mecanismo compensador nos segmentos distais do néfron, foi estudada a expressão do cotransportador NKCC2 (principal responsável pela reabsorção de sódio na parte espessa da alça ascendente de Henle. Como visto na figura 4a, a expressão



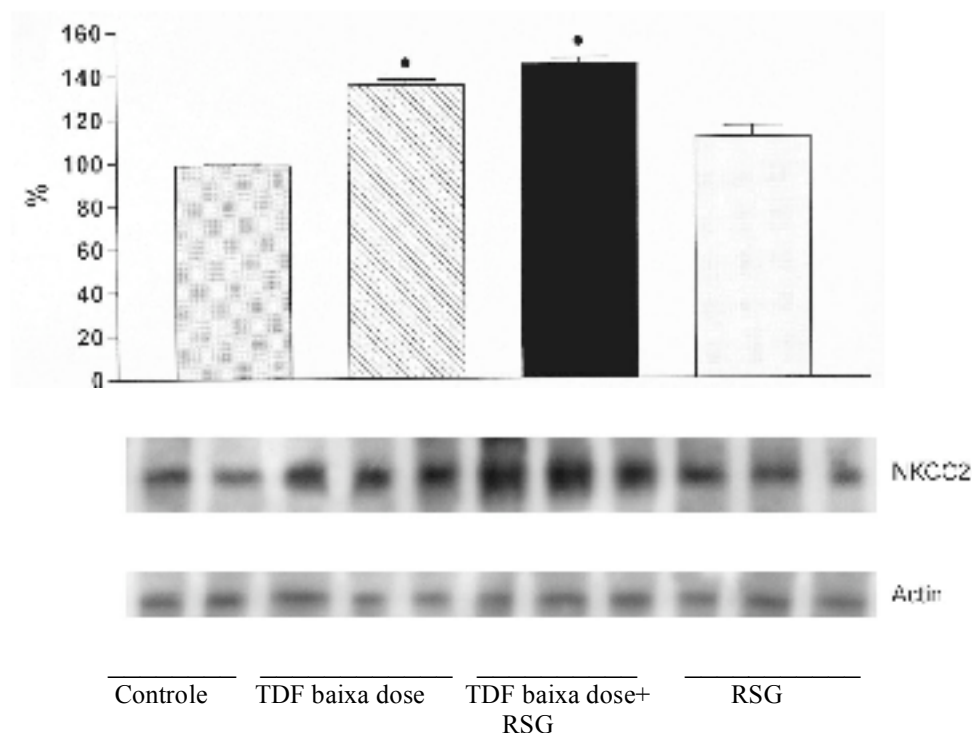
protéica do NKCC2 em homogeneizados de medula renal estava aumentada em relação ao grupo controle ( $136 \pm 2.2$  vs.  $99 \pm 1\%$ ,  $p < 0.001$ ).

#### 4.8 A expressão de AQP2 está alterada em ratos tratados com TDF

Como visto na figura 4b, o tratamento com TDF em baixas doses reduziu a expressão protéica da AQP2 ( $67.5 \pm 2.5$  vs.  $99 \pm 1\%$ ,  $p < 0.01$ ). Essa redução pode explicar, ao menos parcialmente, a redução da capacidade de concentração urinária nesses animais.

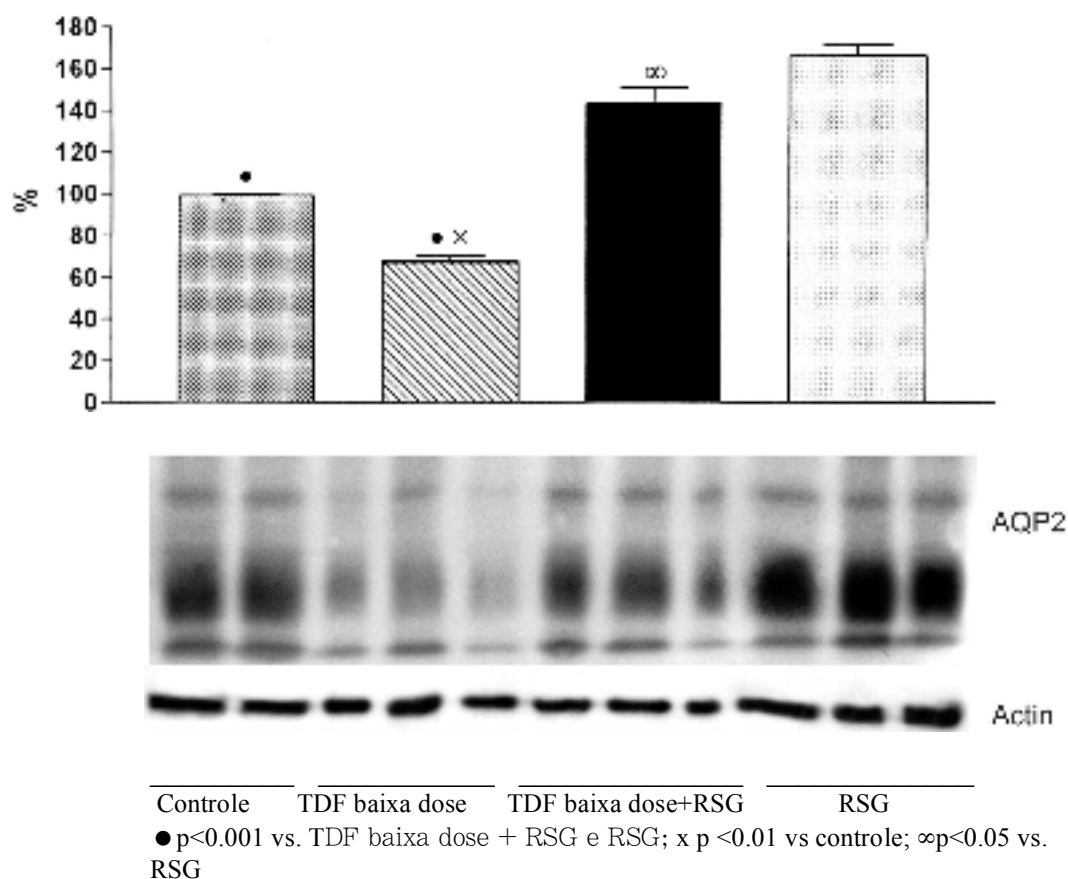
**Figura 4:** Análise semiquantitativa das membranas preparadas da medular renal. Análise densitométrica de todas as amostras dos grupos controle, TDF baixa dose, TDF baixa dose + RSG e RSG. a: Os animais do grupo TDF baixa dose e TDF baixa dose + RSG apresentaram aumento da expressão do cotransportador NKCC2 em relação ao grupo controle. As membranas reagiram com o anticorpo anti-NKCC2, revelando uma banda de 146 a 176-kDa. b: Os níveis de AQP2 foram completamente restaurados em resposta a RSG, o qual também aumentou em relação ao grupo controle. As membranas reagiram com o anticorpo anti-AQP2, revelando bandas de 29, 35 e 50kDa.

**a.**



●  $p < 0.001$  vs. controle e RSG

b.



#### 4.9 Uso de RSG está associado à normalização do cotransportador NaPi-IIa em ratos previamente tratados com TDF

Em ratos recebendo baixas doses de TDF, a administração concomitante de RSG foi associado à restauração da expressão da NaPi-IIa (figura 2a), fato correlacionado com a reversão da hiperfosfatúria observado no grupo TDF baixa dose + RSG. Não houve alteração significativa da expressão protéica do cotransportador NaPi-IIa no grupo RSG quando comparado ao grupo controle.

#### **4.10 A melhora da acidose metabólica induzida pelo TDF e a restauração da expressão do NHE3 está associada ao uso de RSG**

No grupo TDF baixa dose + RSG, a expressão protéica do NHE3 foi maior que no grupo TDF baixa dose ( $93.3 \pm 4.4$  vs.  $59 \pm 2.1$ ,  $p < 0.01$ ; figura 2b), sendo comparável à expressão protéica observada no grupo controle ( $93.3 \pm 4.4$  vs.  $100 \pm 1\%$ ,  $p = ns$ ). Os ratos do grupo RSG não apresentaram diferença significativa na expressão protéica do NHE3 em relação ao grupo controle (grupo RSG  $108 \pm 7.3$  vs.  $100 \pm 1\%$  no grupo controle,  $p = ns$ ).

#### **4.11 A expressão protéica do $\alpha$ -ENaC encontra-se aumentada em animais tratados com TDF e RSG**

A figura 3 mostra que a expressão do transportador  $\alpha$ -ENaC foi maior no grupo TDF baixa dose + RSG quando comparado aos grupos controle e TDF baixa dose ( $145 \pm 4.9$  vs.  $100$  vs.  $108.3 \pm 1.7\%$ , respectivamente,  $p < 0.001$  pela ANOVA). No grupo RSG, a expressão do  $\alpha$ -ENaC estava aumentada em relação ao grupo controle ( $155 \pm 2.9\%$ ,  $p < 0.001$ ). Houve ainda um aumento da expressão do  $\alpha$ -ENaC no grupo RSG em relação ao grupo TDF baixa dose + RSG ( $p < 0.05$ ).

#### **4.12 A expressão protéica do NKCC2 está aumentada em animais tratados com TDF e RSG**

Na figura 4a, verifica-se que o grupo TDF baixa dose + RSG apresentou expressão de NKCC2 semelhante aos animais do grupo TDF baixa dose ( $145 \pm 2.9$  vs.  $136 \pm 2.2\%$ ,  $p = ns$ ). A expressão do NKCC foi significativamente maior nos grupos TDF baixa dose e TDF baixa dose + RSG quando comparado aos grupos

controle e RSG ( $p < 0.001$ ). os animais do grupo RSG, a expressão do transportador NKCC2 não teve alteração significativa em relação ao grupo controle (RSG:  $111 \pm 5.2\%$ ).

#### **4.13 A expressão de AQP2 é aumentada em animais tratados com TDF e RSG**

Na figura 4b, observa-se que o grupo TDF baixa dose + RSG apresenta expressão de AQP2 superior aos ratos do grupo TDF baixa dose ( $143.3 \pm 7.2$  vs.  $67.5 \pm 2.5\%$ ,  $p < 0.001$ ). Além do mais, a abundância da expressão da AQP2 foi maior no grupo TDF baixa dose em relação ao grupo controle ( $143.3 \pm 7.2$  vs.  $99 \pm 1\%$ ,  $p < 0.001$ ). No grupo RSG, a expressão da AQP2 foi aumentada quando comparado ao grupo controle (grupo RSG:  $165 \pm 5.4\%$ ,  $p < 0.001$ ). Houve ainda um aumento significativo da expressão de AQP2 no grupo RSG em relação ao grupo TDF baixa dose + RSG ( $p < 0.05$ ).

## 5. Discussão

O tratamento com TDF causou um amplo espectro de nefrotoxicidade, incluindo redução do ritmo de filtração glomerular, lesão tubular proximal parcial, manifestando-se por hiperfosfatúria e acidose tubular proximal, além de alteração da capacidade de concentração urinária. A queda do ritmo de filtração glomerular mostrou-se dose-dependente e ocorreu de forma associada a uma redução da expressão protéica da eNOS. As alterações tubulares ocorreram em consonância com a redução de alguns transportadores epiteliais (NaPi-IIa, NHE3, e AQP2). Outro dado importante dos experimentos realizados foi o fato do uso de RSG estar associado a uma reversão de todas as alterações renais induzidas pelo TDF.

### **5.1 A queda da filtração glomerular induzida pelo TDF é dose-dependente e associada a uma redução da expressão da eNOS**

Em estudos experimentais envolvendo células de túbulos proximais isoladas de humanos, o TDF apresentou menor potencial nefrotóxico outros inibidores nucleosídeos da transcriptase reversa (cidofovir, adefovir).[13] Entretanto, outros estudos mostram que pacientes recebendo esquemas antiretrovirais com TDF apresentam disfunção renal de forma mais prevalente que outros pacientes com SIDA que não fazem uso de TDF.[33] Esses dados ainda são controversos em literatura, pois outras séries mostram que esquemas antiretrovirais contendo TDF não causam mais injúria renal que a terapia antiretroviral sem uso de TDF.[19]

O TDF, sendo o único representante de uma nova classe de medicamentos contra o vírus HIV – os inibidores nucleosídeos da transcriptase reversa, tornou-se a droga de escolha em muitos esquemas terapêuticos sugeridos tanto para pacientes

virgens de tratamento como naqueles que apresentam falência terapêutica a outros esquemas.

No presente estudo, os animais que receberam doses elevadas de TDF desenvolveram importante e severa queda do ritmo de filtração glomerular associado à intensa vasoconstrição renal. No grupo de animais que recebeu doses baixas de TDF esses fatos não foram observados. Tem sido sugerido na literatura que o TDF causa dano direto ao epitélio do túbulo proximal, o que levaria à queda da filtração glomerular.[34] Os dados apresentados demonstram que outro mecanismo contribui para a queda da filtração glomerular induzida pelo TDF, sendo mediada pela queda da expressão da eNOS.

## **5.2 RSG reverte a redução da eNOS e melhora a disfunção renal induzida pelo TDF**

Vários estudos demonstraram que os agonistas do PPAR- $\gamma$  são agentes eficazes em atenuar a progressão da glomeruloesclerose diabética ou não-diabética, melhoram a injúria renal pela isquemia-reperfusão, assim como a nefotoxicidade da cisplatina.[27, 30, 35, 36] Polikandriotis e colaboradores demonstraram que a RSG aumenta a produção de óxido nítrico através de vias sinalizadoras dependentes do PPAR.[37] Song e colaboradores estudaram ratos normais que receberam RSG por 3 dias e mostraram que a expressão da eNOS estava aumentada no tecido renal desses animais.[31] A pressão arterial desses animais estava reduzida assim como o clearance de creatinina. No presente estudo, foi mostrado que a administração de RSG durante 15 dias não causou alteração no clearance de creatinina. Ao contrário, a administração de RSG e a normalização da expressão da eNOS foi associado a uma melhora da função renal em animais recebendo TDF. Pode-se especular que sob

condições de vasoconstrição renal, como a induzida pelo TDF, a vasodilatação causada pela RSG tem efeitos benéficos.

### **5.3 A lesão tubular proximal induzida pelo TDF mostrou ser limitada aos transportadores de sódio**

Na série de experimentos de TDF baixa dose, foram observadas apenas alterações tubulares sem qualquer alteração significativa no clearance de creatinina. Em pacientes recebendo TDF, tem sido relatados casos de disfunção tubular associada ou não à queda do ritmo de filtração glomerular.[38] Tem sido demonstrado que o uso de TDF causa disfunção tubular proximal, incluindo glicosúria, proteinúria tubular, hiperfosfatúria e acidose tubular renal. Kinai e Hanbusa estudaram pacientes que estavam iniciando esquema antiretroviral contendo TDF e encontraram 12 de 17 pacientes com elevados níveis de beta-2-microglobulina urinária acompanhado de uma diminuição da reabsorção tubular de fósforo.[38]

No modelo experimental de nefrotoxicidade induzida pelo TDF demonstrado nesse trabalho, os efeitos no túbulo proximal foram específicos para os transportadores de sódio (NHE3 e NaPi-IIa), uma vez que não foram observados glicosúria ou aumento da proteinúria. É possível que uma exposição mais prolongada dos animais ao TDF pudesse levar a uma disfunção tubular proximal generalizada como a descrita em humanos.

Um dos achados mais consistentes da nefrotoxicidade do TDF em humanos é a hipofosfatemia.[ Os ratos do grupo TDF baixa dose apresentaram hiperfosfatúria sem alteração da filtração glomerular.

Baseado em nossos achados, podemos sugerir fortemente que a hiperfosfatúria induzida pelo TDF é mediada principalmente pela redução na expressão renal do



transportador NaPi-IIa. Esse transportador se localiza no túbulo proximal e é responsável por aproximadamente 80% da reabsorção de fosfato ao longo do néfron. O mecanismo pelo qual o TDF induz a redução da expressão da NaPi-IIa permanece desconhecida. Entretanto, os altos níveis de TDF nas células tubulares proximais pode contribuir para essa disfunção celular no túbulo proximal.

A acidose metabólica com ânion-gap normal observada nos ratos estudados é consistente com acidose tubular proximal, uma vez que o pH urinário permaneceu baixo. Localizado no túbulo proximal, o contratransportador NHE3 é o principal responsável pela regeneração e reabsorção de bicarbonato. Houve uma redução da expressão do NHE3 no córtex renal sugerindo um papel para o NHE3 na acidose metabólica induzida pelo TDF. A possibilidade que outros transportadores (anidrase-carbônica basolateral tipo II e IV ou o cotransportador sódio-bicarbonato NBC1) estão envolvidos na acidose metabólica induzida pelo TDF não pode ser descartada.

Apesar dos ratos tratados com TDF em baixa dose apresentarem uma significativa redução na expressão de transportadores proximais de sódio, não houve diferença na excreção de sódio entre esse grupo de animais e o grupo controle. Devido à redução desses transportadores proximais de sódio (especialmente o NHE3) o aporte de fluido para segmentos distais do nefron devem estar aumentadas. É possível que o aumento na expressão observado no transportador NKCC2 apresentado pelos animais tratados com TDF represente uma resposta compensatória ao aumento do aporte de cloreto de sódio e água para esse segmento. Tem sido demonstrado que a abundância dos transportadores de sódio está aumentada em resposta ao uso crônico de diuréticos em ratos.[40] Esse mecanismo compensatório também pode explicar a ausência de aumento da caliurese nesse modelo de nefrotoxicidade, apesar da hipocalcemia ser descrita em pacientes recebendo TDF.[41]

#### 5.4 A toxicidade tubular do TDF não é restrita ao túbulo proximal

Alguns casos de diabetes insipidus nefrogênico foram descritos em pacientes recebendo TDF.[20,23] Em todos os casos descritos os pacientes também estavam recebendo ritonavir ou lopinavir, os quais tem sido implicados em alterações do balanço hidro-eletrolítico. A *multidrug resistance protein* (MRP1) é expressa na membrana basolateral das células do túbulo proximal, na alça de Henle e no ducto coletor cortical. A inibição do MRP1 leva a uma redução da resposta do epitélio renal à vasopressina e pode contribuir para o surgimento de diabetes insipidus nefrogênico. É sabido também que o ritonavir inibe a MRP1, assim tem sido sugerido que apenas a combinação do TDF com ritonavir induz diabetes insipidus em alguns pacientes.[34] Entretanto, esses experimentos demonstram que o TDF tem um efeito direto na redução da expressão de AQP2, levando a uma redução da capacidade de concentração urinária e a um estado de diabetes insipidus nefrogênico parcial.

Em estudos prévios, Andrade e colaboradores demonstraram que outro agente antiviral, aciclovir, induz hiperfosfatúria e hipofosfatemia, sendo acompanhado de poliúria e aumento da excreção urinária de sódio, potássio e magnésio.[42] De forma similar ao TDF, o aciclovir induziu uma redução da expressão da NaPi-IIa e AQP2. Entretanto, diferente do TDF, aciclovir também induziu uma queda da expressão do NKCC2.

Uma vez que o aciclovir é a droga de escolha no tratamento da encefalite herpética e varicela-zoster em pacientes imunodeprimidos, não é incomum a associação de TDF e aciclovir em pacientes com SIDA, levando a um aumento do risco de nefrotoxicidade.

### 5.5 O tratamento com RSG reverte a toxicidade tubular induzida pelo TDF

É conhecido que as células tubulares renais expressam o PPAR- $\gamma$ , especialmente no túbulo coletor, mas também estão expressos nas células do túbulo proximal.[27] Song e colaboradores estudaram os efeitos da RSG no túbulo renal de ratos.[31] Esses autores demonstraram que o tratamento com RSG aumenta significativamente a expressão renal de NHE3, NaPi-IIA, NKCC2 e AQP2. Esses dados forneceram uma base teórica para que a RSG fosse estudada na redução da toxicidade tubular induzida pelo TDF.

Além do seu efeito protetor na queda da filtração glomerular induzida pelo TDF, a RSG associou-se à normalização da expressão da NaPi-IIA, NHE3 e AQP2, dessa forma melhorando a hiperfosfatúria, acidose metabólica e o diabetes insípido nefrogênico.

O TDF é eliminado através da filtração glomerular e da secreção tubular ativa. Através desse último mecanismo, os transportadores de ânions orgânicos levam o TDF através da membrana basolateral, após o qual é secretado dentro do lúmen tubular. Essa segunda rota de eliminação induz a elevadas concentrações de TDF nas células tubulares proximais, fato que pode aumentar sua nefrotoxicidade.[43]

Uma vez que a RSG é metabolizada quase que totalmente, a fórmula inalterada da droga não é excretada na urina. As principais de metabolismo são através da N-demetilação e hidroxilação, seguido da conjugação com sulfatos e ácido glucorônico. Todos os metabólitos circulantes da RGS são considerados menos potentes que a droga ativa.[44] Tem sido demonstrado que, seguindo uma administração oral ou intravenosa de maleato de rosiglitazona marcado com C14, aproximadamente 64% e 23% da dose é eliminada na urina e nas fezes respectivamente. [44] Não é completamente entendido como a RSG afeta a expressão

dos transportadores renais e poucos dados existem sobre esse tópico. Guan e colaboradores demonstraram que as tiazolidinedionas aumentam a expressão do mRNA do Scnn1g, o qual decodifica a subunidade gama do ENaC , indicando que o PPAR- $\gamma$  tem um efeito direto no gene.[45]

Tem sido descrito aumento da incidência de infarto do miocárdio e da mortalidade de etiologia cardiovascular associado ao uso de RSG.[46] Além disso, 10-15% dos pacientes tratados com tiazolidinedionas desenvolvem edema, requerendo a descontinuação da terapia.[47] No presente estudo o peso corpóreo e a osmolalidade urinária foram elevados no grupo RSG quando comparado com o grupo controle. O grupo RSG também apresentou um aumento significativo da excreção urinária de sódio, potássio e fósforo em comparação com o grupo controle. Nós sugerimos que o aumento da excreção urinária desses íons é associada a uma expansão do volume extracelular, causado por um aumento na expressão do ENaC e AQP2. Considerando esses achados recentes , o uso crônico da RSG deve ser avaliado com cautela.

Em conclusão, o TDF causou queda da filtração glomerular de forma dose dependente associada a uma grande redução da expressão da eNOS e intensa vasoconstrição renal. Mas, foi demonstrado que a toxicidade tubular induzida pelo TDF envolve a redução da expressão do NHE3 , NaPi-IIa e AQP2. O aumento da expressão do NKCC2 nos ratos tratados com TDF parece ser o mecanismo compensatório desencadeado pelo aumento do aporte distal de sódio. Mais importante, a RSG reverteu todos os mecanismos da nefrotoxicidade induzida pelo TDF, restabelecendo a expressão da eNOS , NHE3 , NaPi-IIA e AQP2, assim como normalizando os parâmetros bioquímicos.

## 6. Conclusões

- O Tenofovir DF causa redução do ritmo de filtração glomerular de forma dose-dependente, associado à vasoconstrição renal e redução da expressão da eNOS.
- As alterações tubulares do Tenofovir DF parecem ser específicas para alguns transportadores epiteliais (NaPi-IIa, NHE3 e AQP2).
- O Tenofovir DF induz aumento da expressão do NKCC2, mecanismo que pode ser compensatório.
- A rosiglitazona reverteu todas as alterações renais induzidas pelo Tenofovir DF.

## 7. Referências

1. Franceschini N, N.S., Eron Jr JJ, et al, Incidence and etiology of acute renal failure among ambulatory HIV-infected patients. *Kidney Int*, 2005. 67(4): p. 1526-31.
2. Shaw J-P, S.C., Oliyai R, et al., Metabolism and pharmacokinetics of novel oral prodrugs of 9-[R-2-(phosphonomethoxy)propyl]denine (PMPA) in dogs. *Pharm Res*, 1997. 14(12): p. 1824-9.
3. Van Gelder J, D.S., Naesens L, et al., Intestinal absorption enhancement of the ester prodrug tenofovir disoproxil fumarate through modulation of the biochemical barrier by defined ester mixtures. *Drug Metab Dispos*, 2002. 30(8): p. 924-30.
4. Robbins BL, S.R., Kim C, et al., Anti-human immunodeficiency virus activity and cellular metabolism of a potential prodrug of the acyclic nucleoside phosphonate 9-R-(2-phosphonomethoxypropyl)adenine (PMPA), bis(isopropylloxymethylcarbonyl) PMPA. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998. 42(3): p. 612-7.
5. Barditch-Crovo P, D.S., Colier A, et al., Phase I/II trial of the pharmacokinetics, safety, and antiretroviral activity of tenofovir disoproxil fumarate in human immunodeficiency virus-infected adults. *Antimicrob Agents Chemoter*, 2001. 45(2733-39).
6. Scooley RT, R.P., Myers RA, et al., Tenofovir DF in antiretroviral-experienced patients: results from a 48-week, randomized, double-blind study. *AIDS*, 2002. 16: p. 1257-63.



7. Squires K, P.A., Pierone G, Jr, et al., Tenofovir disoproxil fumarate in nucleoside-resistant HIV-1 infection: a randomized trial. *Ann Intern Med*, 2003. 139: p. 313-20.
8. Yeni PG, H.S., Hirsch MS, et al., Treatment for adult HIV infection: 2004 recommendation of the international AIDS society - USA panel. *JAMA*, 2004. 292(2): p. 251-65.
9. Van Bommel F, W.T., Mauss S, et al., Comparison of adefovir and tenofovir in the treatment of lamivudine-resistant hepatitis B virus infection. *Hepatology*, 2004. 40(6): p. 1421-5.
10. Nunez M, P.-O.M., Diaz B, et al., Activity of tenofovir on hepatitis B virus replication in HIV-co-infected patients failing or partially responding to lamivudine. *AIDS*, 2002. 16: p. 2352-54.
11. Nelson M, P.S., Stebbing J, et al., An open-label study of tenofovir in HIV-1 and hepatitis B virus co-infected individuals. *AIDS*, 2003. 17(Suppl): p. F7-F10.
12. Benhamou Y, T.R., Thibault V., Tenofovir disoproxil fumarate in patients with HIV and lamivudine-resistant hepatitis B virus. *N Engl J Med*, 2003. 348: p. 177-78.
13. Cihlar T, B.G., Greenwalt D, et al., Tenofovir exhibits low cytotoxicity in various human cell types: comparison with other nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Antiviral Res*, 2002. 54: p. 37-45.
14. FDA Report: Background package for NDA 21-356: VIREAD (tenofovir disoproxil fumarate. [http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/01/briefing/3792b1\\_03\\_FDA-tenofovir.pdf](http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/01/briefing/3792b1_03_FDA-tenofovir.pdf).
15. Gilead Sciences Inc. (US). Truvada™ (emtricitabine and tenofovir disoproxil fumarate) tablets: package insert. Foster City (CA):Gilead Sciences Inc. (US). 2004.

16. Imaoka T, K.H., Adachi-Akahane S, et al. The renal-specific transporter mediates facilitative transport of organic anions at the brush border membrane of mouse renal tubules. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 2012-22.
17. Cihlar T, H.E., Lin D, Mulato A. Human renal organic anion transporter 1 (hOAT1) and its role in the nephrotoxicity of antiviral nucleotide analogs. *Nucleosides Nucleotides Nucl Acids* 2001; 20: 641-8.
18. Jones R, S.J., Nelson M, et al. Renal dysfunction with tenofovir disoproxil fumarate-containing highly active antiretroviral therapy regimens is not observed more frequently: a cohort and case-control study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004; 37: 1489-95.
19. Izzedine H, Hulot JS, Vittecoq D, et al. Long-term renal safety of tenofovir disoproxil fumarate in antiretroviraive HIV-1-infected patients. Data from a double-blind randomized active-controlled multicentre study. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20: 743-746.
20. Verhelst D, Monge M, Meynrd J-L, et al. Fanconi syndrome and renal failure induced by tenofovir: a first case report. *Am J Kidney Dis* 2002; 40: 1331-33.
21. Breton G, A.M., Duval X, et al. Tubulopathy consecutive to tenofovir-containing antiretroviral therapy in two patients infected with human immunodeficiency virus-1. *Scand J Infect Dis* 2003;36: 527-8.
22. Barrios A, G.-B.T., Gonzalez-Lanhoz J, et al. Tenofovir-related nephrotoxicity in HIV-infected patients. *AIDS* 2004; 18: 960-3.
23. Karras A, L.M., Furco A. Tenofovir-related nephrotoxicity in HIV-infected patients: three cases of renal failure, Fanconi syndrome, and nephrogenic diabetes insipidus. *Clin Infect Dis* 2003; 17: 935-7.

24. Hansen A-B EG, M.S., Gerstoft J. Severe metabolic acidosis and renal failure in an HIV-1 patient receiving tenofovir. *Scand J Infect Dis* 2004; 36: 389-91.
25. Desvergne B, W.W., Peroxisome proliferator-activated receptor: Nuclear control of metabolism. *Endocr Rev*, 1999. 20: p. 649-688.
26. Francis GA, A.J.-S., Auwerx J, PPAR-alpha effects on the heart and other vascular tissues. *AM J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003. 285: p. H1-H9.
27. Guan, Y., Peroxisome proliferator-activated receptor family and its relationship to renal complications of the metabolic syndrome. *J Am Soc Nephrol*, 2004. 15: 2801-15.
28. Zhang Y, P.C., Zheng F, et al., Endogenous PPARgamma ameliorates diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 2003. 14: p. 392A.
29. Isshiki K, H.M., Koya D, et al., Thiazolidinedione compounds ameliorate glomerular dysfunction independent of their insulin-sensitizing action in diabetic rats. *J Am Soc Nephrol*, 2000. 15: p. 2801-15.
30. Ma LJ, Marcantoni C., Linton, MF, et al., Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist troglitazone protects against nondiabetic glomerulosclerosis in rats.. *Kidney Int*, 2001. 59.
31. Song J, Knepper M., Hu X, et al., Rosiglitazone activates renal sodium- and water-reabsorptive pathways and lowers blood pressure in normal rats. *J Pharm Exp Therap*, 2004. 308(2): p. 426-33.
32. Biesecker G, Karimi S, Desjardins J. Evaluation of mitochondrial DNA content and enzyme levels in tenofovir DF-treated rats, rhesus monkeys and woodchucks. *Antiviral Res* 2003; 58(3):217-225.
33. Mauss S, Berger F, Schmutz G. Antiretroviral therapy with tenofovir is associated with mild renal dysfunction. *AIDS* 2005; 19(9):993-995.

34. Izzeddine H, Launay-Vacher V, Deray G. Antiviral drug-induced nephrotoxicity. *Am J Kidney Dis* 2005; 45(5): 804-817.
35. Sivarajah A, Chatterjee PK, Patel NS, et al. Agonists of peroxisome-proliferator activated receptor-gamma reduce renal ischemia/reperfusion injury. *Am J Nephrol* 2003; 23(4): 267-276.
36. Lee S, Kim W, Moon SO, et al. Rosiglitazone ameliorates cisplatin-induced renal injury in mice. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21(8): 2096-2105.
37. Polikandriotis JA, Mazzella LJ, Rupnow HL, Hart CM. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Ligands Stimulate Endothelial Nitric Oxide Production Through Distinct Peroxisome Proliferator-Activated Receptor – Dependent Mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005 ;25(9):1810-1816.
38. Kinae E, Hanabusa H. Renal tubular toxicity associated with tenofovir assessed using urine-beta 2 microglobulin, percentage of tubular reabsorption of phosphate and alkaline phosphatase levels. *AIDS* 2005; 19(17):2031-2033.
39. Izzeddine H, Isnard-Bagnis C, Hulot JS, et al: Renal safety of tenofovir in HIV treatment-experienced patients. *AIDS* 18:1074-1076, 2004.
40. Na KY, Oh YK, Han JS, Joo KW, Lee JS, Earm JH, Knepper MA, Kim GH. Upregulation of Na<sup>+</sup> transporter abundances in response to chronic thiazide or loop diuretic treatment in rats. *Am J Physiol* 2003; 284:F133-F143.
41. Cirino CM, Kam VL. Hypokalemia in HIV patients on tenofovir. *AIDS* 2006; 20(12): 1671-1673.
42. Andrade L, Rebouças NA, Seguro AC. Down-regulation of Na<sup>+</sup> transporters and AQP2 is responsible for acyclovir-induced polyuria and hypophosphatemia. *Kidney International* 2004; 65: 175-183.

43. Ray AS, Cihlar T, Robinson KL et al. Mechanism of active renal tubular efflux of tenofovir. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:3297-3304.
44. Cox PJ, Ryan DA, Hollis AM et al. Absorption, disposition, and metabolism of rosiglitazone, a potent thiazolidinedione insulin sensitizer, in humans. *Durg Metab Dispos* 2000; 28:772-780.
45. Guan YF, Hao C, Cha DR et al. Thiazolidinediones expand body fluid volume through PPAR stimulation of ENaC-mediated renal salt absorption. *Nature Medicine* 2005; 11:861-866.
46. Nissen SE, Wolski K. Effect of Rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. *N Engl J Med* 2007; 356: 2457-2571.
47. Mudaliar S, Chang AR, Henry RR. Thiazolidinediones, peripheral edema and type 2 diabetes: incidence, pathophysiology, and clinical implications. *Endocr Pract* 2003; 9:406-416.

