PEDRO HENRIQUE FRANÇA GOIS

**Administração de tenofovir em ratas Wistar durante a gestação:
efeitos na prole**

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

Programa de Nefrologia

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Seguro

SÃO PAULO

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Gois, Pedro Henrique França

Administração de tenofovir em ratas Wistar durante a gestação : efeitos na prole / Pedro Henrique França Gois. -- São Paulo, 2014.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Nefrologia.

Orientador: Antonio Carlos Seguro.

Descritores: 1.Tenofovir 2.Gestação 3.Hipertensão 4.Efeitos colaterais e reações adversas relacionados a medicamentos 5.Inibidores de transcriptase reversa/efeitos adversos 6.Taxa de filtração glomerular/efeitos de drogas 7.HIV 8.Síndrome de imunodeficiência adquirida 9.Hepatite B 10.Ratos Wistar

USP/FM/DBD-322/14

Trabalho realizado no Laboratório de Pesquisa Básica em Doenças Renais (LIM12), Departamento de Nefrologia, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com apoio financeiro do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), através do auxílio à pesquisa (Proc. nº 309947/2009-0) e da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), através do auxílio à pesquisa (Proc. nº 2012/50227-9).

Dedico esta tese a minha mãe, que levou uma vida de abdicação para que eu pudesse ter uma educação de qualidade. Não teria chegado tão longe sem o seu apoio incondicional em cada projeto de vida.

“... na sua entrega eu recebi, na sua renúncia eu construí, na sua proteção eu me arrisquei...”

Ana Paula Valadão

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por iluminar o meu caminho de todos os dias, e por todas as pessoas que colocou em minha vida.

Ao **Prof. Dr. Antônio Carlos Seguro**, meu orientador, pela imensa competência acadêmica, pela disponibilidade e generosidade ao longo do desenvolvimento deste trabalho. Obrigado também por me mostrar uma forma tão paternal de ser e de orientar.

À **Dra. Maria Heloisa Massola Shimizu**, minha coorientadora, pela amizade, pela calorosa acolhida, pelas boas risadas, mas também pelos ensinamentos. Muito obrigado por ter enxergado potencial em um visitante interessado em aprender as técnicas de clearance de inulina.

A minha noiva, **Cláudia Facuri**, por me apoiar desde o começo nesse projeto, mesmo que isso tenha significado a distância, por me ouvir, me aconselhar e me apaziguar nos momentos difíceis, e por sempre me estimular a crescer científica e pessoalmente. Obrigado por ser minha “parzinha” para a vida.

À **Dra. Daniele Canale**, pela disponibilidade incondicional e presença em todas as etapas deste trabalho, pelos diversos ensinamentos, mas principalmente pela preciosa amizade.

À minha família, à qual incluo os meus sogros **Walterlice e Taufick Facuri**, pelo inestimável apoio e por possibilitar que as idas e vindas entre Campinas-São Paulo fossem menos sofridas.

Aos meus amigos **Dr. Weverton Luchi** e **Ms. Daniela Ferreira**, pela amizade, pelas parcerias, e pelos momentos de entusiasmo compartilhados em conjunto.

À **Ms. Monique Martinez**, pela amizade, pela amabilidade em me receber neste laboratório e pelos conhecimentos compartilhados.

Ao **Dr. Rildo Volpini**, pela competência e disponibilidade, pelos momentos de descontração durante a pesada rotina de trabalho, bem como pelas precisas correções e sugestões nesta tese.

À **Dra. Adriana Girardi** pelos anticorpos cedidos e pelas sugestões, que foram de extremo valor para o enriquecimento deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Joel Cláudio Heimann** e à **Dra. Luzia Naoko Shinohara Furukawa** que gentilmente cederam o laboratório para as aferições de pressão caudal. Agradeço também pelos questionamentos e pelas sugestões durante a minha banca de qualificação, que foram bastante importantes para a conclusão desta tese.

À bioterista **Denise Ariane de Jesus**, pela prestimosa ajuda com os “ratinhos”.

À **Prof. Dra. Lúcia Andrade**, ao **Prof. Dr. Antonio José de Barros Magaldi** e à **Prof. Dra. Cláudia Helou**, que não participaram diretamente deste trabalho, mas que contribuíram para a minha formação.

Aos demais colegas, **Dra. Talita Rojas Sanches**, **Dra. Ana Carolina de Bragança**, **Letícia Urbano**, **José Manuel Córdor**, **Prof. Ms. Roberto Moreira**, **Dra. Camila Eleutério**, **Eloá Neves** e **Nivaldo Francisco da Silva**, pelo companheirismo e pela forma carinhosa como sempre fui tratado.

À **Dra. Mariana Matera Veras** e à **Natalia Costa**, pela contribuição com a estereologia.

Ao **Prof. Dr. Luis Yu** por me abrir as primeiras portas desta instituição.

Ao **Prof. Dr. Edison Souza** e ao **Prof. Dr. Jorge Reis**, que desde o dia em que me conheceram, foram grandes incentivadores para que eu seguisse o caminho da nefrologia.

Por fim, mas não menos importante, aos ratos Wistar, que deram a vida para que este trabalho fosse realizado.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e Siglas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 <u>EPIDEMIOLOGIA</u>	1
1.2 <u>TENOFOVIR</u>	2
1.3 <u>FARMACOCINÉTICA DO TENOFOVIR</u>	2
1.4 <u>TENOFOVIR E TOXICIDADE MITOCONDRIAL</u>	3
1.5 <u>EFEITOS DO TENOFOVIR SOBRE A FILTRAÇÃO GLOMERULAR</u>	4
1.6 <u>EFEITOS DO TENOFOVIR SOBRE A FUNÇÃO TUBULAR</u>	5
1.7 <u>TENOFOVIR E A GESTAÇÃO</u>	6
2. OBJETIVOS	8
2.1 <u>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</u>	8
3. METODOLOGIA	9
3.1 <u>ANIMAIS</u>	9
3.2 <u>PROTOCOLO EXPERIMENTAL</u>	9
3.2.1 <u>Grupo Materno</u>	9
3.2.2 <u>Grupo Prole</u>	10
3.3 <u>ESTUDOS DE GAIOLA METABÓLICA</u>	11
3.4 <u>MEDIDAS DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA</u>	11
3.5 <u>DETERMINAÇÃO DA TAXA DE FILTRAÇÃO GLOMERULAR: CLEARANCE DE INULINA</u>	12
3.6 <u>DOSAGENS</u>	13
3.7 <u>ANÁLISE HISTO-MORFOMÉTRICA E ESTIMATIVA ESTEREOLÓGICA DO VOLUME RENAL, DO NÚMERO DE GLOMÉRULOS E DO VOLUME GLOMERULAR</u>	13

3.8	<u>ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTEICA: WESTERN BLOTTING</u>	16
3.9	<u>ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA</u>	17
4.0	<u>AVALIAÇÃO DOS GRUPOS MATERNOS</u>	18
4.0.1	<u>Avaliação do Estado Redox: Ensaio de TBARS Urinário</u>	18
4.0.2	<u>Estudos Hemodinâmicos</u>	19
4.1	<u>ANÁLISE ESTATÍSTICA</u>	19
5.	<u>RESULTADOS</u>	20
5.1	<u>DADOS ANTROPOMÉTRICOS</u>	20
5.2	<u>PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA</u>	22
5.3	<u>DADOS DO CLEARANCE DE INULINA</u>	23
5.4	<u>PARÂMETROS BIOQUÍMICOS</u>	23
5.5	<u>ANÁLISE HISTO-MORFOMÉTRICA E ESTIMATIVA ESTEREOLÓGICA DO VOLUME RENAL, DO NÚMERO DE GLOMÉRULOS E DO VOLUME GLOMERULAR</u>	24
5.6	<u>WESTERN BLOTTING</u>	25
5.6.1	<u>Sistema Renina Angiotensina Aldosterona</u>	25
5.6.2	<u>Transportadores renais de sódio</u>	28
5.7	<u>ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA</u>	31
5.8	<u>AVALIAÇÃO MATERNA</u>	33
6.	<u>DISCUSSÃO</u>	34
6.1	<u>PROGRAMAÇÃO FETAL</u>	34
6.2	<u>TENOFOVIR E O CRESCIMENTO FETAL</u>	34
6.3	<u>CRESCIMENTO COMPENSATÓRIO (CATCH UP DE CRESCIMENTO)</u>	36
6.4	<u>HIPERATIVAÇÃO DO SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA ALDOSTERONA</u>	37
6.5	<u>TEORIA DA REDUÇÃO DA MASSA DE NÉFRONS</u>	38
6.6	<u>RETENÇÃO SALINA E O PAPEL DOS TRANSPORTADORES RENAIIS DE SÓDIO</u>	39
6.7	<u>DISLIPIDEMIA PROGRAMADA</u>	40
7.	<u>CONCLUSÃO</u>	41

<u>8.</u>	<u>ANEXOS</u>	42
8.1	<u>TABELAS</u>	42
<u>9.</u>	<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>Aldo</i>	Aldosterona Plasmática
<i>Ang</i>	Angiotensinogênio
<i>ARV</i>	Antirretrovirais
<i>AT1r</i>	Receptor AT1 da Angiotensina II
<i>CEP</i>	Comitê de Ética e Pesquisa
<i>CDC</i>	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
<i>CIUR</i>	Crescimento Intrauterino Retardado
<i>Col T</i>	Colesterol Total
<i>CYP7A1</i>	Colesterol 7 α -Hidroxilase (Citocromo P)
<i>DNA</i>	Ácido Desoxirribonucleico
<i>DNA_m</i>	DNA Mitocondrial
<i>ECA</i>	Enzima Conversora da Angiotensina
<i>ENaC</i>	Canal Epitelial de Sódio
<i>EPM</i>	Erro Padrão da Média
<i>eNOS</i>	Óxido Nítrico Sintetase Endotelial
<i>FDA</i>	<i>Food and Drug Administration</i>
<i>FSR</i>	Fluxo Sanguíneo Renal
<i>HAART</i>	Terapia Antirretroviral Altamente Ativa
<i>HAS</i>	Hipertensão Arterial Sistêmica
<i>HIV</i>	Vírus da Imunodeficiência Humana
<i>HMG-CoAr</i>	3-Hydroxy-3-Metil-Glutaril-CoA Redutase
<i>IRA</i>	Injúria Renal Aguda
<i>ITRN</i>	Inibidor da Transcriptase Reversa Análogo Nucleotídeo
<i>MRP2</i>	<i>Multidrug Resistance-Associated Protein 2</i>
<i>MRP4</i>	<i>Multidrug Resistance-Associated Protein 4</i>

MS	Ministério da Saúde
NCC	Cotransportador Na-Cl
<i>Nglom</i>	Número Total de Glomérulos
NKCC2	Cotransportador Na-K-2Cl
NO	Óxido Nítrico
<i>Nvglom</i>	Densidade Numérica Glomerular
OAT1	Transportador Aniônico Orgânico Tipo 1
OAT3	Transportador Aniônico Orgânico Tipo 3
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PC	Peso Corpóreo
PIG	Pequeno para a Idade Gestacional
Pol γ	DNA polimerase γ
RVR	Resistência Vascular Renal
SRAA	Sistema Renina Angiotensina Aldosterona
SF	Síndrome de Fanconi
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
TARV	Terapia Antirretroviral
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TCA	Ácido Tricloroacético
TDF	Tenofovir Disoproxil Fumarato
TFG	Taxa de Filtração Glomerular
TP	Túbulo Proximal
$U_{Na}V$	Excreção Urinária de Sódio
U_KV	Excreção Urinária de Potássio
VT_{comp}	Volume Total de Cada Compartimento Renal
VT_{renal}	Volume Total do Rim

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Protocolo Experimental.....	11
Figura 2.	Peso Corporal ao Nascimento.....	21
Figura 3.	Peso Corporal ao Longo do Seguimento (Curva de Crescimento) ...	21
Figura 4.	Comprimento Naso-anal.....	22
Figura 5.	Pressão Arterial Sistólica ao Longo do Seguimento.....	22
Figura 6.	Clearance de Inulina (em mL/min)	23
Figura 7.	Concentração Plasmática de Aldosterona.....	24
Figura 8.	Histopatologia do córtex renal.....	25
Figura 9.	Avaliação Semiquantitativa da Expressão Proteica de Angiotensinogênio no Tecido Renal.....	26
Figura 10.	Avaliação Semiquantitativa da Expressão Proteica do Receptor do Tipo 1 da Angiotensina II (AT1r) no Tecido Renal.....	27
Figura 11.	Avaliação Semiquantitativa da Expressão Proteica da Enzima Conversora da Angiotensina (ECA) no Tecido Renal.....	27
Figura 12.	Avaliação Semiquantitativa da Expressão Proteica do Cotransportador Na-K-2Cl (NKCC2) no Tecido Renal.....	28
Figura 13.	Avaliação Semiquantitativa da Expressão Proteica do Cotransportador Na-Cl (NCC) no Tecido Renal.....	29
Figura 14.	Avaliação Semiquantitativa da Expressão Proteica do Canal epitelial de sódio (ENaC) subunidade α no Tecido Renal.....	30
Figura 15.	Avaliação Semiquantitativa da Expressão Proteica do Canal epitelial de sódio (ENaC) subunidade β no Tecido Renal.....	30
Figura 16.	Avaliação Semiquantitativa da Expressão Proteica do Canal epitelial de sódio (ENaC) subunidade γ no Tecido Renal.....	31

Figura 17. Quantificação de Células Positivas para Angiotensina II no Córtex Renal..... 32

Figura 18. Imunolocalização de Angiotensina II no Córtex Renal..... 32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Parâmetros Bioquímicos Avaliados nos Animais dos Grupos Tenofovir (TDF) e Controle (C) ao 3º e ao 6º Mês de Idade.....	42
Tabela 2.	Medidas Histo-morfométricas, Estimativa Estereológica do Volume Renal e Número de Glomérulos.....	43
Tabela 3.	Parâmetros Bioquímicos e Funcionais das Mães dos Grupos Tenofovir (TDF) e Controle (C) 48h após o Parto.....	44

RESUMO

Gois, PHF. **Administração de Tenofovir em ratas Wistar durante a gestação: efeitos na prole.** [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2014.

Introdução: Tenofovir disoproxil fumarate (TDF) é um inibidor da transcriptase reversa análogo nucleotídeo que tem sido usado por gestantes para o tratamento da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), bem como para a prevenção da transmissão vertical do vírus. Até o momento, não há estudos experimentais ou em humanos sobre a incidência de alterações renais nos fetos expostos a esquemas contendo TDF. **Objetivo:** Verificar a ocorrência de alterações renais e sistêmicas fetais causadas pelo uso do TDF durante a gestação. **Metodologia:** Ratos Wistar fêmeas receberam dieta padrão com ou sem adição de TDF (100mg/Kg de dieta) desde uma semana antes do cruzamento até o parto. A prole proveniente do grupo TDF foi colocada com uma mãe adotiva não tratada durante o período de amamentação e foi comparada com a prole de ratas que receberam dieta padrão durante a gestação (grupo controle). Controle e TDF foram acompanhados até três (n=9 para cada grupo) e seis (n=12 e n=10, respectivamente) meses de idade. Foram avaliados: peso corporal (PC) e pressão arterial sistólica (PAS) mensais, contagem de glomérulos, função renal (através do clearance de inulina), parâmetros bioquímicos (proteinúria, colesterol total, sódio e potássio séricos e urinários), e expressão proteica do tecido renal para componentes do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) e para transportadores de sódio. **Resultados:** A prole TDF apresentou menor PC ao nascimento em comparação com o controle. Após o 3º mês, o grupo TDF demonstrou um crescimento compensatório, atingindo o sexto mês com maior PC. O peso renal foi menor no grupo TDF, porém, não houve diferença do número de néfrons entre os

grupos. O grupo TDF apresentou alterações estruturais glomerulares. Observou-se também um aumento progressivo da PAS após o segundo mês de idade no grupo TDF. Não houve diferença estatística na função renal entre os grupos. Os níveis plasmáticos de aldosterona foram mais elevados no grupo TDF, em associação com um aumento da expressão renal do SRAA. Ratos do grupo TDF apresentaram menor excreção renal de sódio e maior expressão renal de transportadores de sódio.

Conclusões: Esta é a primeira descrição, a partir de um modelo experimental, que a utilização do TDF durante a gestação resulta em hiperativação do SRAA, aumento da expressão dos transportadores renais de sódio e hipertensão arterial da prole.

Descritores: tenofovir, gestação, hipertensão, efeitos colaterais e reações adversas relacionados a medicamentos, inibidores de transcriptase reversa/efeitos adversos, taxa de filtração glomerular/efeitos de drogas, HIV, síndrome de imunodeficiência adquirida, hepatite B, ratos Wistar

SUMMARY

Gois, PHF. **Administration of tenofovir during pregnancy in Wistar rats: effects on the offspring.** [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2014.

Introduction: Tenofovir disoproxil fumarato (TDF) is a nucleotide reverse transcriptase inhibitor that has been used in pregnant for treatment of maternal HIV infection and for prevention of vertical transmission. Currently, there are no published studies providing data regarding the occurrence of renal abnormalities in fetuses exposed to TDF-containing regimens. **Objective:** To evaluate the occurrence of systemic and renal abnormalities in offspring of Wistar rats exposed to TDF during pregnancy. **Methods:** Female Wistar rats received a standard diet, with or without addition of TDF (100 mg/Kg diet), one week before mating and during pregnancy. Offspring from the TDF group were placed with an untreated foster mother during breastfeeding and compared with offspring from rats maintained on a standard diet during mating and pregnancy (control). Control and TDF were followed up at three and six months of age. Analyzed data: monthly body weight and systolic blood pressure (SBP), glomerular counting, renal function, biochemical parameters, and renal tissue immunoblotting for renin angiotensin aldosterone system (RAAS) and renal sodium transporters. **Results:** TDF offspring showed lower birth weight compared with the control group. After the third month, growth among the TDF group experienced a rapid catch-up. SBP increased progressively after the second month of age in the TDF group. The nephron number did not differ between groups. The TDF group showed glomerular structural changes. There was no significant difference in renal function between the groups studied. Plasma aldosterone was higher in the TDF group, associated with a significant increase in renal expression of RAAS. The TDF rats showed upregulation of renal sodium transporters and consequently lower urinary sodium excretion. **Conclusions:**

This is the first demonstration using an experimental model that maternal exposure to TDF during gestation results in over activation of RAAS, upregulation of renal sodium transporters and hypertension of the offspring.

Keywords: tenofovir, pregnancy, hypertension, drug-related side effects and adverse reactions, reverse transcriptase inhibitors/adverse effects, glomerular filtration rate/drug effects, HIV, acquired immunodeficiency syndrome, hepatitis B, Wistar rats.

1. Introdução

1.1. Epidemiologia

A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) é um problema de saúde pública que afeta aproximadamente 35 milhões de pessoas ao redor do mundo, sendo a metade deste número representada pelas mulheres [1]. A cada minuto, uma mulher jovem é infectada pelo HIV. A prevalência da infecção pelo HIV entre mulheres jovens, de 15 a 24 anos de idade, chega a ser o dobro do que em homens da mesma faixa etária. Em alguns países, mais de 10% das mulheres jovens infectadas pelo HIV pertencem a este grupo etário, correspondente à idade fértil [2].

De 1980 a junho de 2007, foram notificados no Brasil um total de 474273 casos da síndrome da imunodeficiência humana (SIDA), dos quais 160 mil são mulheres. A razão de sexo (H:M) vem diminuindo ao longo dos anos, passando de 15 homens para cada uma mulher em 1986 para 15 homens para cada 10 mulheres (1,5:1) em 2005 [3]. Em 2004, foram identificadas 12409 parturientes infectadas pelo HIV e a taxa de prevalência de parturientes HIV+ foi de 0,41 % [4].

Avanços na terapia antirretroviral, incluindo a terapia antirretroviral altamente ativa (HAART), resultaram na importante redução da carga viral do vírus HIV em pacientes soropositivos. O uso de antirretrovirais (ARV) tem se tornando cada vez mais rotineiro entre mulheres grávidas infectadas pelo HIV. De acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (*Centers for Disease Control and Prevention* – CDC), aproximadamente 8700 gestantes/ano são portadoras do HIV e mais de 4000 crianças são expostas intra-útero a várias drogas antirretrovirais [5]. Outro aspecto importante a se considerar é a passagem transplacentária dos ARV, implicada tanto na teratogenicidade quanto na toxicidade para o feto e para o recém-nascido [6].

Apesar da exposição crescente materno-fetal aos ARV, os estudos, tanto em animais quanto em humanos, são escassos sobre a segurança destas medicações para a gestante e para o feto [6,7].

1.2. Tenofovir

O tenofovir disoproxil fumarato (TDF) é um análogo nucleotídeo da adenosina monofosfato, que após sofrer duas reações de fosforilação intracelular, transforma-se em seu metabólito ativo, o tenofovir difosfato. Em sua forma ativa, o TDF compete com o substrato natural deoxiadenosina 5'-trifosfato pela incorporação no DNA durante a transcrição reversa induzida pelo HIV. Essa incorporação do tenofovir no DNA viral resulta em uma cadeia terminal, uma vez que o tenofovir difosfato não possui o grupamento hidroxila na posição 3', que atua como ponto de ligação para o próximo deoxirribonucleosídeo trifosfato, responsável pelo alongamento do DNA viral. Dessa forma, a transcriptase reversa, evento chave para a proliferação do HIV, é inibida [8,9].

O TDF foi o primeiro inibidor do nucleotídeo da transcriptase reversa (ITRN) aprovado pela Administração para Alimentos e Drogas dos Estados Unidos (*Food and Drug Administration* - FDA) e pela Agência Europeia de Medicina (*European Medicine Agency*) para o tratamento da infecção pelo HIV em adultos e tem sido utilizado como medicamento antirretroviral desde 2001 [10]. Atualmente, o TDF é considerado uma medicação de primeira linha no tratamento da SIDA, fazendo parte de diversas combinações da HAART, e desde 2008 têm sido indicado no tratamento da hepatite crônica pelo vírus B em adultos [11].

1.3. Farmacocinética do Tenofovir

Estudos em animais e em humanos demonstraram que a nefrotoxicidade induzida pelo TDF depende principalmente da concentração plasmática da medicação, que por sua vez sofre influência da dose ingerida, do volume de distribuição e da

excreção renal [12,13]. Altas concentrações intracelulares de TDF em células tubulares podem interferir na função celular e acarretar efeitos colaterais danosos, especialmente com o seu uso prolongado [14,15].

O tenofovir não é degradado pelo organismo e é eliminado na urina através de uma combinação de filtração glomerular e secreção tubular, especialmente pelo túbulo proximal (TP). O tenofovir entra pela membrana basolateral das células do TP através de transportadores aniônicos orgânicos 1 e 3 (OAT1 e OAT3), atravessa a célula e é secretado no lúmen tubular com auxílio da proteína 4 relacionada à resistência a múltiplas drogas (*multidrug resistance-associated protein 4* - MRP4) [12,13,16]. Acredita-se que a proteína 2 relacionada à resistência a múltiplas drogas (*multidrug resistance-associated protein 2* – MRP2) também esteja relacionada ao transporte do TDF na membrana apical [16].

Nos últimos anos, tem sido estudado o polimorfismo gênico relacionado à codificação das proteínas transportadoras associadas ao transporte do tenofovir nos túbulos proximais. O polimorfismo do gene ABCC4, que codifica a MRP4, está associado a níveis plasmáticos mais elevados de tenofovir [17], enquanto isso, foi demonstrado que o polimorfismo do ABCC2 (codifica a MRP2) está relacionado à disfunção tubular em indivíduos que fazem uso da droga [18].

1.4. Tenofovir e a Toxicidade Mitocondrial

Tanto a infecção pelo HIV quanto os ITRN estão associados à toxicidade mitocondrial. Os ITRN inibem a DNA polimerase γ (Pol γ) levando a depleção do DNA mitocondrial (DNAm) [19]. Estudos animais, em macacos rhesus e em ratos, demonstraram que a exposição ao TDF não reduziu os níveis de DNAm, sugerindo que a toxicidade mitocondrial do TDF não estaria ligada à inibição da Pol γ , mas sim à alteração estrutural da mitocôndria [20]. Em humanos, o aspecto característico da toxicidade mitocondrial aos TP é de mitocôndrias dismórficas e edemaciadas à

microscopia eletrônica [21]. Além disso, tem sido descrita a depleção do RNA mitocondrial em pacientes em uso de TDF associado à didanosina, sugerindo que a exposição a outro ITRN potencialize a toxicidade mitocondrial induzida pelo TDF [22]. Um estudo recente comparando pacientes em uso de TDF e abacavir mostrou que o TDF está associado a aumento da excreção urinária da cadeia enzimática mitocondrial citocromo C, ou seja, evidência indireta de lesão mitocondrial [23].

1.5. Efeitos do Tenofovir sobre a Filtração Glomerular

Libório *et al.* demonstraram que ratos expostos a altas doses de TDF apresentaram aumento da pressão arterial e piora da função renal. Houve uma redução significativa da taxa de filtração glomerular (TFG), avaliada através do clearance de creatinina. A injúria renal aguda (IRA) foi descrita como isquêmica neste modelo - decorrente de vasoconstrição renal. Houve importante redução do fluxo sanguíneo e aumento da resistência vascular renal. Foi demonstrado também a redução da expressão proteica renal da óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS) nos animais expostos ao TDF. Assim, o TDF, quando em doses elevadas, pode causar IRA através da redução da produção do óxido nítrico (NO) [24].

No mesmo estudo, quando administradas doses menores de TDF, também houve redução do ritmo de filtração glomerular no grupo tratado com a medicação, apesar de esta diferença não ter sido estatisticamente significativa. Observou-se também, pelo mesmo mecanismo dependente da eNOS, a redução significativa do fluxo sanguíneo e o aumento da resistência vascular renal secundários à administração do TDF [24].

1.6. Efeitos do Tenofovir sobre a Função Tubular

O alvo principal da nefrotoxicidade do TDF é o TP, levando ao comprometimento do transporte de solutos neste segmento do néfron. As apresentações clínicas mais comuns da nefrotoxicidade pelo TDF são: a) disfunção tubular proximal com função renal preservada e b) disfunção tubular proximal com piora da função renal [25,26].

A Síndrome de Fanconi (SF) é a tubulopatia proximal completa, caracterizada pela perda urinária de solutos que normalmente seriam reabsorvidos no TP, como o fosfato, o bicarbonato, proteínas de baixo peso molecular e aminoácidos. A disfunção tubular proximal pode preceder o declínio da função renal. Nos pacientes usuários de TDF, a perda de fosfato urinária é a clinicamente mais relevante, podendo levar à hipofosfatemia e consequentemente à osteomalácia, a dores ósseas e a fraturas [27,28].

Estima-se que a incidência de SF induzida por TDF seja de 1%. Entretanto, acredita-se que a incidência real seja subestimada, devido à ausência de critérios diagnósticos bem definidos para esta síndrome. No entanto, estudos prospectivos e observacionais demonstraram que a disfunção subclínica do TP é a alteração mais comum associada ao TDF, com uma prevalência estimada de 20%. Ainda não se sabe se as alterações renais leves ocasionadas pelo TDF sejam fatores contribuintes para a progressão de dano renal e de doença renal crônica [29].

Em resumo, a disfunção do TP induzida pelo TDF pode variar de leve a severa e tal déficit pode ocorrer mesmo na ausência de qualquer anormalidade na TFG. Os mecanismos de nefrotoxicidade do TDF ainda não estão inteiramente elucidados e requerem mais estudos. Fatores de risco têm sido atribuídos à nefrotoxicidade, entretanto, efeitos colaterais renais podem ocorrer na ausência destes, isto é, deve-se descartar alterações renais secundárias ao uso do TDF em todos os usuários desta droga [29].

1.7. Tenofovir e a Gestação

No Brasil, o Ministério da Saúde (MS) recomenda que toda gestante infectada pelo HIV deva receber terapia antirretroviral durante a gestação, seja com a finalidade de profilaxia da transmissão vertical ou do tratamento da infecção pelo vírus [30].

O TDF é classificado pela FDA como droga de categoria B para uso durante a gestação. Isso significa que estudos em animais não conseguiram demonstrar um risco para o feto e não há estudos clínicos de boa qualidade realizados em mulheres grávidas. No entanto, a Organização Mundial da Saúde (OMS), a despeito da classificação na categoria B, incluiu o TDF como opção terapêutica nas últimas diretrizes para profilaxia da transmissão vertical do HIV [31,32].

No Brasil, devido à ausência de evidências suficientes para recomendar o uso de TDF com segurança na gestação, o MS não recomenda o uso rotineiro de HAART contendo TDF durante a gestação. Em algumas situações específicas, deve-se até considerar a relação de risco-benefício para iniciar o TDF durante a gestação, como por exemplo, no caso de gestantes “multiexperimentadas” em relação à terapia antirretroviral (neste caso, o início da terapia deve ser orientado por genotipagem) e/ou coinfectadas com o HIV e o vírus da hepatite B (HBV) [30].

Diversos estudos demonstraram uma série de eventos adversos associados ao uso de ARV durante a gestação, tais como parto prematuro, abortamento e baixo peso ao nascer [33-35]. Em macacas rhesus grávidas, a administração de altas doses de TDF durante a gestação resultou em uma maior incidência de baixo peso ao nascer, o que não foi demonstrado com a aplicação de doses semelhantes à de humanos [2,6,36].

As evidências sobre o impacto do uso de HAART contendo TDF durante a gestação são escassas e o foco das atenções está voltado, na maioria dos estudos, para os dados antropométricos ao nascimento e para as alterações ósseas fetais [37]. Atualmente, não há dados experimentais ou em humanos sobre a incidência de

alterações renais tanto na gestante quanto no feto expostos a esquemas contendo TDF.

2. Objetivos

Verificar a ocorrência de alterações renais e sistêmicas na prole de ratas que receberam TDF durante a gestação.

2.1. Objetivos Específicos

Investigar os eventos associados às alterações renais e sistêmicas encontradas;

Avaliar os parâmetros bioquímicos e funcionais dos grupos maternos controle e TDF.

3. Metodologia

Os experimentos realizados neste projeto foram aprovados pela Comissão de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEP-FMUSP: Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, protocolo nº 071/13) e executados de acordo com as diretrizes locais e com os padrões internacionais para manipulação e cuidado de animais de laboratório.

3.1. Animais

Ratos Wistar machos e fêmeas (*Rattus norvegicus*), provenientes do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pesando aproximadamente 180g, foram mantidos em gaiolas de plástico, em condições controladas de temperatura ($23\pm 1^{\circ}\text{C}$), com ciclos claro-escuros fixos de 12 horas e receberam ração comercial Nuvilab CR-1 (Nuvital - Colombo, PR - Brasil) e água *ad libitum*.

3.2. Protocolo Experimental

3.2.1. Grupo Materno

Após uma semana de aclimação, as ratas receberam dieta padrão (Nuvilab CR-1) ou dieta contendo TDF na dose de 100mg/Kg de ração. Na semana seguinte, as ratas foram acasaladas com ratos machos Wistar adultos. Para o acasalamento, três fêmeas e um macho permaneceram juntos durante 21 dias. As ratas foram pesadas semanalmente e o consumo alimentar e hídrico foi avaliado durante todo período gestacional.

O grupo materno foi dividido em: a) Mães controle - receberam dieta padrão durante o seguimento b) Mães adotivas - também receberam dieta padrão; c) Mães

TDF: receberam dieta padrão com adição de TDF (100mg/Kg de ração) a partir de quatro semanas de vida;

3.2.2. Grupo Prole

Após o parto, o tamanho da ninhada foi reduzido para apenas seis machos/mãe, sempre que possível, a fim de se minimizar a variação nutricional da prole durante a amamentação. Os neonatos excedentes, bem como os provenientes das mães adotivas, foram eutanasiados, pela injeção intra-peritoneal de excesso de anestésico (pentobarbital sódico), em ambiente tranquilo e adequado, longe de outros animais e do alojamento dos mesmos. O descarte foi realizado de acordo com as orientações da cartilha de descarte de resíduos do sistema FMUSP-HC [38]. Durante o período de amamentação, com duração de 25 dias, a prole das mães TDF foi separada da mãe e colocada com uma mãe adotiva, a fim de simular a situação real em humanos, ou seja, mulheres soropositivas não devem amamentar seus próprios filhos ou doar leite [30].

A prole das mães TDF (grupo TDF) e das mães controle (grupo controle) foram acompanhadas durante três meses (n=9 para cada grupo) e seis meses de idade (n=10 no grupo TDF e n=12 no grupo controle). O grupo TDF e o controle foram avaliados quanto ao número de nativos, natimortos, peso corpóreo (PC) – ao nascimento e semanalmente até o final do estudo - e comprimento naso-anal – ao nascimento, com uma e duas semanas de idade. A figura 1 ilustra o protocolo experimental.

Figura 1: Protocolo experimental

3.3. Estudos de Gaiola Metabólica

No dia anterior à realização do clearance de inulina, os animais dos grupos controle e TDF foram colocados em gaiolas metabólicas (um rato por gaiola), com ciclos claro-escuros de 12 horas, e com acesso livre à água, para coleta de amostras de urina de 24h. Foram medidos os volumes urinários e, em seguida, as amostras de urina foram centrifugadas e alíquotas do sobrenadante foram retiradas para exame. As análises bioquímicas da urina foram realizadas no Laboratório Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.4. Medidas da Pressão Arterial Sistólica

A pressão arterial sistólica (PAS) foi medida mensalmente, a partir do primeiro mês de vida, em ratos acordados, através do método não invasivo de manguito de cauda, utilizando um eletro-esfigmomanômetro (RTBP 2000, Kent Scientific Corporation, Torrington, CT). Os ratos foram colocados em uma sala escura e foram pré-aquecidos a 39°C por 10 minutos. Um manguito de tamanho adequado foi

acoplado à cauda e insuflado até 200 mmHg. Alterações no fluxo sanguíneo foram detectadas por um sensor de *doppler* ultrassônico. Foram realizadas 6-8 leituras, com um intervalo de um minuto entre elas, e a média foi usada como a pressão arterial para o rato.

3.5. Determinação da Taxa de Filtração Glomerular: Clearance de Inulina

Os animais foram anestesiados com tiopental sódico 50 mg/Kg (Cristália, São Paulo, Brasil). A traqueia foi canulada com cateter PE-240, e a respiração foi mantida espontaneamente. A veia jugular foi canulada com cateter PE-60 para a infusão de inulina e de fluidos. Para o controle da pressão arterial média (PAM) e para a coleta de amostras de sangue, a artéria carótida foi cateterizada com cateter PE-60. Para a coleta de amostras de urina, foi feita uma incisão abdominal e a bexiga do animal foi canulada com cateter PE-240. Após o procedimento cirúrgico, uma dose única de inulina (100 mg/Kg diluída em 1 mL de solução salina 0,9%) foi administrada pela veia jugular. Em seguida, uma infusão constante de inulina foi mantida (10 mg/Kg em solução salina 0,9%) a 0,04 mL/min do início ao fim do experimento. Foram coletadas três amostras de urina a cada 30 minutos e amostras de sangue no início e no fim do experimento. Os valores do clearance de inulina representam a média de três períodos de experimento. As concentrações de inulina no sangue e na urina foram determinadas pelo método colorimétrico da Antrona. O clearance de inulina foi expresso em mL/min.

Ao final do experimento de clearance, após a coleta do sangue, os rins foram perfundidos com solução de tampão fosfato salino (PBS, NaCl 0,15 M, tampão fosfato 0,01 M, pH 7,4). O rim direito foi então removido, pesado, congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C para avaliação da expressão proteica de componentes do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) e dos transportadores renais de sódio.

Após a finalização dos experimentos propostos, os animais foram sacrificados pela injeção endovenosa de excesso de anestésico, pentobarbital sódico. Os mesmos foram descartados conforme as orientações da cartilha de descarte de resíduos do sistema FMUSP-HC [38].

3.6. Dosagens

As concentrações séricas e urinárias de sódio e potássio foram mensuradas por fotometria de chama (CELM, modelo FC280, São Paulo, SP, Brasil) e as respectivas excreções urinárias de sódio ($U_{Na}V$) e potássio (U_KV) foram determinadas. O método colorimétrico enzimático (Labtest, Lagoa Santa, Brasil) foi utilizado para quantificar os níveis de colesterol total no soro. A excreção urinária de proteína foi realizada por sistema colorimétrico (COBAS C111 Analyzer - Roche®, USA). Os níveis plasmáticos de aldosterona foram medidos por radioimunoensaio, utilizando-se um kit comercial (RIA Aldosterone, SAS Immunotech, Marselha, França). Os dados laboratoriais da prole controle e TDF foram avaliados no terceiro e no sexto mês de idade.

3.7. Análise Histo-morfométrica e Estimativa Estereológica do Volume Renal, do Número de Glomérulos e do Volume Glomerular

Ao fim de três meses de idade, após os experimentos de clearance de inulina, o rim esquerdo foi perfundido com solução de formalina a 10% a fim de se realizar a análise histo-morfométrica ($n=5$ para o grupo TDF e $n=8$ para o grupo controle).

Volume renal: o rim esquerdo foi retirado imediatamente após o sacrifício, limpo do tecido conjuntivo, pesado e fixado em formalina a 10%. O volume total dos rins (VT_{renal}) foi estimado através do princípio de Cavalieri. Os rins foram seccionados em fatias de 4 mm ($n=7-8$ fatias por rim) [39]. Um sistema de pontos-teste (com áreas de $7,84 \text{ mm}^2=a(p)$), impresso numa folha de acetato, foi sobreposto a cada fatia renal.

O número de pontos incidentes sobre o rim foi contado. O volume total do rim foi estimado utilizando a seguinte fórmula (1):

$$(1) VT_{renal} = \sum ptK * A(p) * t ,$$

onde $\sum ptK$ é a somatória dos pontos incidentes no rim, em todas as secções, (p) é a área associada a cada ponto e t a espessura do corte (t=4 mm).

Volume e densidades de volume de compartimentos renais e número de glomérulos: todos os cortes foram então processados para inclusão em parafina e para cada fatia foi preparado um bloco. De cada bloco foram cortadas secções de 5 µm de espessura, com a ajuda de um micrótomo rotativo. Dois pares de secções aleatórias, com 400 µm de distância entre si, foram dispostas em lâminas de vidro e coradas com hematoxilina e eosina. Também a partir destes blocos, dois cortes seriais foram obtidos no micrótomo, separados por 20 µm (h, dissector alto), formando dois planos de referência. Este método é denominado de dissector físico. Um total de 14-16 pares de cortes foram preparados para cada rim.

As frações volumétricas dos compartimentos renais (pelve, córtex e medula) foram estimadas utilizando uma das secções de todos os pares pelo método de contagem de pontos [40]. As lâminas foram observadas utilizando-se objetiva de 2.5x a fim de se visualizar toda a extensão do rim. Uma grade de teste foi sobreposta às secções e cada ponto estava associado a uma área de 1712 milímetros². Os pontos incidentes foram discriminados conforme sua incidência em córtex, medula ou outras estruturas renais. As frações volumétricas (Vv) de cada compartimento renal foram estimadas usando a seguinte equação (2):

$$(2) Est VV \sum P_{comp} = \sum P_{renal},$$

onde $\sum P_{comp}$ e $\sum P_{renal}$ correspondem à somatória de pontos incidentes sobre todos os campos e secções de cada rim.

Subsequentemente, o volume total de cada compartimento renal (VTcomp) foi calculado multiplicando a sua respectiva fração volumétrica (Vv) pelo volume renal correspondente (VTkidney).

O mesmo procedimento foi aplicado para estimar os volumes e frações volumétricas do corpúsculo renal, dos glomérulos e da cápsula de Bowman, fazendo uso de campos selecionados ao acaso (n=60). Para esta análise, campos aleatórios no córtex renal foram observados em objetiva de 20x e foi utilizado um sistema teste de pontos com uma área por ponto de 1000 μm^2 .

O software CAST (Visionpharm, Dinamarca) foi usado para gerar os sistemas de teste e para fazer a contagem.

O número de glomérulos foi estimado utilizando os dissectores físicos e contados em campos dentro do córtex renal. A seleção dos campos foi realizada de forma aleatória, sistemática e uniforme [41,42]. Para a contagem de glomérulos, as regiões de interesse em ambas as secções (par) foram identificadas e alinhadas. Uma moldura (*frame*), com uma área fixa conhecida de 2,63 milímetros² (a(f)), foi sobreposta em ambas as secções. Os glomérulos visualizados na moldura aplicada sobre a primeira secção, e que não foram encontrados na segunda secção, foram contados (Q). Para aumentar a eficiência do método, os glomérulos presentes na moldura da segunda secção, e que não foram vistos na primeira secção, também foram contados (Q-1). As seguintes fórmulas foram usadas para calcular a densidade numérica glomerular (3) e o número total de glomérulos (4). Glomérulos que apresentam alterações histopatológicas foram contados separadamente (Qa, Qa-1).

$$(3) = N_{\text{vglom}} (\Sigma Q + \Sigma Q - 1 + \Sigma Qa \Sigma Qa - 1) / (2 * ndis * V_{\text{dis}})$$

$$(4) = N_{\text{glom}} = N_{\text{vglom}} * V_{\text{cortex}},$$

onde Q e Q - 1 é a soma de todos os glomérulos contados nos dissectores pares, ndis é o número de dissectores contados por rim e Vdis é o volume do dissector (Vdis=a(f) * dissector alto).

O volume médio dos glomérulos foi calculado como a razão entre o volume total de glomérulos estimado por contagem de pontos e o número total de glomérulos estimado pelo dissector físico.

3.8. Análise da Expressão Proteica: *Western Blotting*

Para a realização da técnica de *Western Blotting* foram utilizadas as amostras de tecido renal dos animais submetidos ao clearance de inulina no sexto mês de idade.

A extração da proteína seguiu o protocolo descrito por Burnette [43], com pequenas modificações. As amostras dos tecidos renais foram homogeneizadas (Polytron PT 10-35) em solução K-Hepes (20 mM Mannitol; 80 mM Hepes; 41 KOH, pH 7,5) com coquetel de inibidores de protease (Cocktail Protease Inhibitor, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO). Em seguida, foram centrifugadas a 4000 rpm por 30 minutos a 4°C para remover núcleo, mitocôndrias e resíduos celulares. As proteínas totais foram quantificadas pelo método de Bradford (Bioagency). As amostras foram separadas de acordo com o peso molecular em minigéis SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) em tampão de corrida (Tris/Glicina/SDS 10%, pH 8,3) e a transferência para membrana de nitrocelulose foi feita com tampão de transferência (Tris/Glicina/metanol 20%). A membrana foi bloqueada com 5% de leite em pó desnatado (Molico, Nestlé) em TBS-T (24,2g Tris base, 29,2g NaCl, 3,36g EDTA para 1 L de água destilada) por 1 hora. A incubação primária foi feita com anticorpo anti-angiotensinogênio (1:1000), anti-receptor tipo 1 da angiotensina II (AT1r) (1:500), anti-enzima conversora da angiotensina (ECA) (1:1000), anti-cotransportador Na-K-2Cl (NKCC2) (1:2000), anti-cotransportador Na-Cl (NCC) (1:500) e anti-canal epitelial de sódio (ENaC: subunidades α , β e γ) (respectivamente 1:500, 1:200, 1:500) em solução de TBS-T, *overnight* a 4°C. Os anticorpos policlonais específicos foram obtidos das seguintes empresas: AT1r, angiotensinogênio, ECA e β ENaC (Santa Cruz

Biotechnology, CA, EUA); NKCC2, α ENaC e γ ENaC (Millipore, CA, EUA); e NCC (Stressmarq, Victoria BC, Canadá). A incubação secundária foi realizada com anticorpo anti-rabbit e anti-goat (Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA) também em solução de TBS-T com 0,1% de leite desnatado. O procedimento de detecção foi baseado em quimioluminescência (ECL, Amersham). A normatização foi feita com uma nova hibridização das membranas com anticorpo anti- α -actina (Santa Cruz, Biotechnology Inc., CA, EUA). A semi-quantificação das proteínas foi feita pelo software Image J for Windows (Image J – NIH Image).

3.9. Análise Imuno-histoquímica

Os cortes de tecido renal foram previamente bloqueados com soro de cabra 10% por 30 minutos em temperatura ambiente e incubados com anticorpo primário de coelho anti-angiotensina II (Peninsula Laboratories, Inc., EUA) na diluição 1:2000 *overnight* à temperatura de 4°C. Após a retirada do excesso de anticorpo primário, o tecido foi lavado com PBS e incubado com o anticorpo secundário anti-coelho biotilado desenvolvido em cabra (Vector, Burlingame, CA, EUA) na diluição 1:500 à temperatura ambiente por 30 minutos. Após nova lavagem com PBS, os tecidos foram incubados com o complexo avidina-biotina-peroxidase (Vector Laboratories Burlingame, CA, EUA) e a cor desenvolvida com 3,3'-diaminobenzidina na presença de água oxigenada. A contracoloração foi realizada com hematoxilina de Harris durante um minuto. As ligações inespecíficas foram bloqueadas pelas diluições dos anticorpos primário e secundário em solução de PBS contendo albumina bovina 1%. Os cortes foram examinados sob microscopia de luz.

Para avaliação da imunorreação para a angiotensina II, as proporções de volume de áreas positivas no tecido renal, determinadas pelo limite de cor, foram obtidas pela análise de imagem usando o software Image-Pro® Plus 4.1 para Windows® (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA) em um computador compatível

ligado a uma câmera digital acoplada a um microscópio (Carl Zeiss Axioskop 40, Eching, Alemanha). A proporção de volume é expressa como a área positiva (μm^2) para a angiotensina II depois de feita a divisão pela área total do campo analisado (μm^2). Os resultados foram expressos como porcentagens.

4.0. Avaliação dos Grupos Maternos

Após 48h do parto, as mães dos grupos controle (n=8) e TDF (n=6) foram submetidas ao experimento de clearance de inulina. A medida da pressão arterial média (PAM) e do fluxo sanguíneo renal (FSR) foram determinados e a resistência vascular renal (RVR) foi calculada. Amostras de sangue e urina de 24h foram utilizadas para análises dos parâmetros bioquímicos e dos níveis urinários de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

4.0.1. Avaliação do Estado Redox: Ensaio de TBARS Urinário

Os níveis urinários de TBARS, que são marcadores de peroxidação lipídica, foram determinados utilizando o ensaio do ácido tiobarbitúrico. Foram utilizadas amostras de urina previamente coletadas durante os experimentos de gaiola metabólica, diluídas na proporção 1:20 (0,2 mL de amostra diluída em 0,8mL de água destilada). Em seguida, foi adicionado 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 17,5% e 1 mL de ácido tiobarbitúrico (0,6% pH 2). A solução foi levada ao banho-maria por 20 minutos. Após o resfriamento em gelo, a mistura foi incubada por 20 minutos com 1 mL de TCA a 70% e centrifugada por 15 minutos a 3000 rpm. A densidade óptica do sobrenadante foi avaliada através da leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 534 nm. A quantidade de TBARS foi calculada utilizando um coeficiente de extinção molar de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [50]. Os níveis urinários de TBARS foram expressos em nmol/24horas.

4.0.2. Estudos Hemodinâmicos

Para o controle da PAM e para a coleta de amostras de sangue, foi inserido um cateter PE-60 na artéria carótida, durante os estudos de clearance de inulina. A PAM foi mensurada através do sistema do aparato Biopac Systems Inc MP100 (Santa Barbara, CA, EUA).

Ao término do procedimento de clearance de inulina, com o objetivo de se avaliar o FSR, foi realizada uma incisão mediana abdominal. O pedículo renal esquerdo foi dissecado e a artéria renal isolada. Cuidadosamente, uma sonda de fluxo ultrassônico foi acoplada na artéria renal e obteve-se a mensuração do fluxo sanguíneo renal em mL/min (T110; Transonic Systems, Bethesda, MD, EUA). A RVR foi calculada dividindo-se a PAM pelo FSR e o resultado foi expresso em mmHg/mL/min.

4.1. Análise Estatística

Todas as variáveis quantitativas foram expressas em média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Para a análise estatística dos dados dos grupos estudados foi utilizado o teste t não pareado. Todas as análises foram realizadas através do programa de estatística GraphPad Prism (versão 5.0). Os valores foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

5. Resultados

5.1. Dados Antropométricos

O grupo TDF mostrou uma redução significativa no PC ao nascimento (TDF = $6,18 \pm 0,48$ vs. controle = $6,55 \pm 0,58$ g, $p=0,0006$) (Figura 2). Esta diferença no PC entre os dois grupos foi observada até o terceiro mês de idade, após o qual os animais do grupo TDF apresentaram um crescimento compensatório, alcançando o sexto mês mais pesados do que o grupo controle (Figura 3). O comprimento naso-anal também foi menor no grupo TDF em comparação com os controles ao nascimento (TDF = $4,78 \pm 0,02$ vs. controle = $4,93 \pm 0,03$ cm, $p=0,009$), com uma semana (TDF = $7,22 \pm 0,05$ vs. controle = $7,78 \pm 0,07$ cm, $p=0,001$) e duas semanas de idade (TDF = $8,95 \pm 0,23$ vs. controle = $9,13 \pm 0,08$ cm, $p<0,0001$) (Figura 4). Não foi observada diferença no tamanho da ninhada ao nascimento nos grupos estudados (TDF: 14 ± 1 vs. controle: 15 ± 1 nascidos vivos/mãe, $p=0,1$). Não houve diferença em número de natimortos entre os grupos TDF e controle. A fim de descartar a influência do processo de adoção na restrição ao crescimento encontrada na prole do grupo TDF, foi realizada, logo após o parto, uma troca da prole de duas mães controle durante o período de amamentação. Os parâmetros antropométricos não foram diferentes entre a prole do grupo controle e a prole do grupo controle que permaneceu com a mãe adotiva. No entanto, ambos os grupos controle mantiveram as mesmas diferenças, quando comparados ao grupo TDF. A ingestão de dieta foi similar entre os grupos (20-25 g/rato/dia).

Figura 2 - Peso corporal ao nascimento: O peso corporal ao nascimento no grupo tenofovir (TDF) mostrou-se reduzido em relação ao grupo controle (C). Valores expressos em média $\pm$ EPM. *** $p < 0,0001$; TDF vs. C.

Figura 3 - Peso corporal ao longo do seguimento (curva de crescimento): Observa-se uma retomada do crescimento no grupo tenofovir (TDF), alcançando o sexto mês de vida com maior peso corporal em relação ao grupo controle (C). Valores expressos em média $\pm$ EPM. * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$; TDF vs. C.

Figura 4 – Comprimento naso-anal: O comprimento naso-anal foi menor no grupo tenofovir (TDF) em comparação com os controles (C) ao nascimento, com sete e quinze dias de vida. Valores expressos em média $\pm$ EPM. ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$; TDF vs. C.

5.2. Pressão Arterial Sistólica

Conforme demonstrado na figura 5, a pressão arterial sistólica aumentou após 30 dias de idade no grupo TDF (TDF = 138 ± 3 vs. controle = 111 ± 2 mmHg, $p < 0,001$) e persistiu elevada até os seis meses de seguimento (TDF = 155 ± 2 vs. controle = 119 ± 2 mmHg, $p < 0,0001$).

Figura 5 – Pressão arterial sistólica ao longo do seguimento: A pressão arterial sistólica aumentou progressivamente após 30 dias de idade no grupo tenofovir (TDF) em relação ao grupo controle (C). Valores expressos em média $\pm$ EPM. *** $p < 0,0001$; TDF vs. C.

5.3. Dados do Clearance de Inulina

Os animais do grupo TDF não mostraram diferença estatística na TFG, avaliada pelo clearance de inulina, no terceiro e no sexto mês de idade em relação aos controles, como demonstrado a seguir: terceiro mês, TDF = $3,3 \pm 0,2$ vs. controle = $3,8 \pm 0,2$ mL/min, $p=0,1$; sexto mês, TDF = $3,2 \pm 0,2$ vs. controle = $3,0 \pm 0,2$ mL/min, $p=0,4$ (Figura 6).

Figura 6: Clearance de inulina (em mL/min): Não houve diferença estatística na função renal, avaliada através do clearance de inulina, entre os grupos tenofovir (TDF) e controle (C) aos três ($n=9$ para ambos os grupos) e seis meses de idade ($n=8$ para o grupo TDF e $n=7$ para o grupo controle). Valores expressos em média $\pm$ EPM.

5.4. Parâmetros Bioquímicos

O sódio plasmático foi maior no grupo TDF (TDF = 152 ± 3 vs. controle = 142 ± 3 mEq/L, $p=0,02$) ao sexto mês de idade. A $U_{Na}V$ foi significativamente menor nos ratos do grupo TDF ao três e aos seis meses de idade, como demonstrado na tabela 1. Não houve diferença nos níveis plasmáticos de cálcio e fósforo entre os grupos estudados. A aldosterona plasmática foi maior no grupo TDF em comparação com o controle (terceiro mês: 256 ± 45 vs. controle = 112 ± 23 pg/mL, $p=0,017$; sexto mês: TDF = 247 ± 28 vs. 116 ± 26 pg/mL, $p=0,002$) (Figura 7). Os animais do grupo TDF apresentaram maiores níveis de colesterol total aos seis meses de idade (TDF = 72 ± 3 vs. controle = 52 ± 4 mg/dL no controle, $p=0,002$). Não foi observada proteinúria nos

animais de ambos os grupos ao sexto mês de seguimento (TDF $11,1 \pm 0,8$ vs. $11,8 \pm 0,5$ controle mg/24h, $p=0,6$). A Tabela 1 mostra os parâmetros bioquímicos avaliados no terceiro e sexto meses de idade.

Figura 7 - Concentração plasmática de aldosterona: A aldosterona plasmática foi maior no grupo tenofovir (TDF) em comparação com os controles (C) no terceiro ($n=6$ para ambos os grupos) e no sexto mês de idade ($n=13$ para o grupo TDF e $n=11$ para o grupo controle). Valores expressos em média $\pm$ EPM. * $p<0,01$; ** $p<0,001$; TDF vs. C.

5.5. Medidas Histo-morfométricas e Estimativa Estereológica do Volume Renal, Número de Glomérulos e Volume Glomerular

A prole TDF apresentou uma redução significativa de peso renal no terceiro mês de vida (peso renal/PC $\times 100$: $0,41 \pm 0,01$ vs. $0,36 \pm 0,01$, $p=0,03$). Conforme exposto na tabela 2, o volume total do rim, bem como os volumes dos demais compartimentos renais e o número total de corpúsculos renais, não foram diferentes entre os grupos TDF e controle. No entanto, verificamos que a prole TDF apresentou alterações estruturais glomerulares em cerca de 12% do número total de néfrons (4846 ± 1455 unidades glomerulares alteradas), como demonstrado na figura 8. A atrofia glomerular (*glomerular shrinkage*) foi a anormalidade mais comumente encontrada. Espessamento da camada parietal da cápsula de Bowman e diminuição da capilarização glomerular também foram encontrados em alguns glomérulos. A

avaliação do interstício e dos túbulos não demonstrou presença de fibrose intersticial ou atrofia tubular nos grupos estudados. Não foram observadas alterações vasculares, como a arterio- ou aterosclerose, nos animais estudados.

Figura 8 – Histopatologia do córtex renal. Fotomicrografia com baixa (a) e alta (b) ampliação de rins de ratos do grupo controle (n=8), mostrando corpúsculos renais normais e glomérulos de tamanho normal. Rins de ratos do grupo tenofovir (n=5), mostrando atrofia glomerular (c, *), alargamento do espaço capsular (d, seta) e redução da capilarização do glomérulo (e, seta).

5.6. Western Blotting

5.6.1. Sistema Renina Angiotensina Aldosterona

Foram avaliadas as expressões renais de diversos componentes do SRAA. Os ratos do grupo TDF apresentaram um aumento importante na expressão proteica renal de angiotensinogênio (TDF = 129 ± 9 vs. controle = 101 ± 1 %, $p < 0,05$), de AT1r (TDF = 173 ± 23 vs. controle = 100 ± 11 %, $p = 0,03$), da ECA (TDF = 214 ± 27 vs. controle =

$100 \pm 6\%$, $p=0,01$), reforçando o papel da ativação renal do SRAA na patogênese da hipertensão neste modelo experimental (Figuras 9-11).

Figura 9 – Avaliação semiquantitativa da expressão proteica de angiotensinogênio (Ang) no tecido renal: A) Densitometria das amostras de ratos controles (C) e ratos do grupo tenofovir (TDF) ($n=7$ para o grupo TDF e $n=4$, para o grupo controle); B) Foto ilustrativa da expressão de Ang e de α -actina no tecido renal. Valores expressos em média $\pm$ EPM; ** $p<0,001$; TDF vs. C.

Figura 10 – Avaliação semiquantitativa da expressão proteica do receptor do tipo 1 da angiotensina II (AT1r) no tecido renal: A) Densitometria das amostras de ratos controles (C) e ratos do grupo tenofovir (TDF) (n=7 para o grupo TDF e n=4, para o grupo controle); B) Foto ilustrativa da expressão de AT1r e de α -actina no tecido renal. Valores expressos em média $\pm$ EPM; * $p < 0,01$; TDF vs. C.

Figura 11 – Avaliação semiquantitativa da expressão proteica da enzima conversora da angiotensina (ECA) no tecido renal: A) Densitometria das amostras de ratos controles (C) e ratos do grupo tenofovir (TDF) (n=7 para o grupo TDF e n=4, para o grupo controle); B) Foto ilustrativa da expressão da ECA e de α -actina no tecido renal. Valores expressos em média $\pm$ EPM; * $p < 0,01$; TDF vs. C.

5.6.2. Transportadores Renais de Sódio

É bem conhecido que os transportadores NKCC2 e NCC são fundamentais na reabsorção de sódio, respectivamente, na porção ascendente espessa da alça de Henle e no túbulo conorcido distal. Os ratos do grupo TDF mostraram maior expressão renal do NKCC2 (TDF = 148 ± 6 vs. controle = $100 \pm 7\%$, $p = 0,0007$) e do NCC (TDF = 120 ± 5 vs. controle = $99 \pm 7\%$, $p = 0,03$) em comparação com o grupo controle, conforme demonstrado respectivamente nas figuras 12 e 13.

Figura 12 – Avaliação semiquantitativa da expressão proteica do cotransportador Na-K-2Cl (NKCC2) no tecido renal: A) Densitometria das amostras de ratos controles (C) e ratos do grupo tenofovir (TDF) ($n=7$ para o grupo TDF e $n=4$, para o grupo controle); B) Foto ilustrativa da expressão de NKCC2 e de α -actina no tecido renal. Valores expressos em média $\pm$ EPM; * $p<0,01$; TDF vs. C.

Figura 13 – Avaliação semiquantitativa da expressão proteica do cotransportador Na-Cl (NCC) no tecido renal: A) Densitometria das amostras de ratos controles (C) e ratos do grupo tenofovir (TDF) ($n=6$ para o grupo TDF e $n=4$, para o grupo controle); B) Foto ilustrativa da expressão de NCC e de α -actina no tecido renal. Valores expressos em média $\pm$ EPM; * $p<0,01$; TDF vs. C.

Outra transportador chave no manejo renal de sódio é o canal epitelial de sódio (ENaC). Ele é composto por três subunidades (α , β , γ) envolvidas na reabsorção de sódio no túbulo coletor. Como demonstrado nas figuras 14-16, a expressão renal do ENaC em ratos tratados com TDF foi significativamente maior do que nos ratos do grupo controle (respectivamente, α -ENaC: TDF = 147 ± 2 vs. controle = $102 \pm 2\%$, $p < 0,0001$; β -ENaC: TDF = 138 ± 11 vs. controle = $99 \pm 8\%$, $p = 0,02$; γ -ENaC: TDF = 151 ± 12 vs. controle = $99 \pm 1\%$, $p = 0,007$).

Figura 14 – Avaliação semiquantitativa da expressão proteica do canal epitelial de sódio (ENaC) subunidade α : A) Densitometria das amostras de ratos controles (C) e ratos do grupo tenofovir (TDF) ($n=6$ para o grupo TDF e $n=4$, para o grupo controle); B) Foto ilustrativa da expressão de α -ENaC e de α -actina no tecido renal. Valores expressos em média $\pm$ EPM; *** $p<0,0001$; TDF vs. C.

Figura 15 – Avaliação semiquantitativa da expressão proteica do canal epitelial de sódio (ENaC) subunidade β : A) Densitometria das amostras de ratos controles (C) e ratos do grupo tenofovir (TDF) ($n=6$ para o grupo TDF e $n=4$, para o grupo controle); B) Foto ilustrativa da expressão de β -ENaC e de α -actina no tecido renal. Valores expressos em média $\pm$ EPM; * $p<0,01$; TDF vs. C.

Figura 16 – Avaliação semiquantitativa da expressão proteica do canal epitelial de sódio (ENaC) subunidade γ : A) Densitometria das amostras de ratos controles (C) e ratos do grupo tenofovir (TDF) ($n=6$ para o grupo TDF e $n=4$, para o grupo controle); B) Foto ilustrativa da expressão de γ -ENaC e de α -actina no tecido renal. Valores expressos em média $\pm$ EPM; ** $p<0,001$; TDF vs. C.

5.7. Análise Imuno-histoquímica

Os animais do grupo TDF apresentaram um aumento da expressão de angiotensina II no interstício renal aos 6 meses de idade (TDF = $8,3 \pm 1,6$ vs. controle = $1,0 \pm 0,2$ %, $p=0,0009$). A angiotensina II marcou o córtex renal dos ratos estudados predominantemente nas células tubulares. A quantificação e a imunolocalização de células positivas para angiotensina II estão representadas respectivamente nas figuras 17 e 18.

Figura 17 – Quantificação de áreas positivas para angiotensina II no córtex renal dos grupos controle (C, n=6) e tenofovir (TDF, n=5) aos 6 meses de idade. Valores expressos em média $\pm$ EPM; *** $p=0,0009$; TDF vs. C.

Figura 18 – Imunolocalização de angiotensina II no córtex renal de um rato controle (C) e de um rato proveniente de mães expostas ao tenofovir durante a gestação (TDF). A imunorreação foi mais intensa no grupo C do que no TDF (400X).

5.8. Avaliação Materna

Não foram observadas diferenças nos parâmetros bioquímicos, nem no balanço redox avaliado através do TBARS urinário, entre as mães do grupo controle e TDF. Os estudos hemodinâmicos (de PAM, FSR e RVR) não demonstraram diferença estatística entre os grupos. As mães do grupo TDF também não apresentaram diferença significativa na TFG, avaliada pelo clearance de inulina, em comparação com as mães do grupo controle. Os níveis de aldosterona plasmática nas mães dos grupos TDF e controle foram superiores àqueles encontrados na prole, devido ao aumento fisiológico da atividade do SRAA durante a gravidez. Não houve diferença no consumo de água e de ração entre as mães dos grupos avaliados.

A tabela 3 apresenta uma visão geral dos parâmetros bioquímicos e funcionais das mães provenientes dos grupos controle e TDF 48h após o parto.

6. Discussão

6.1. Programação Fetal

Programação fetal é o termo utilizado para descrever o conceito de que muitas doenças ou condições adquiridas na vida adulta decorrem de estímulos ambientais durante períodos críticos do crescimento fetal e pós-natal precoce [44]. Diferentes modelos animais foram capazes de realizar modificações no crescimento fetal através da administração de medicações ou de restrições dietéticas durante a gestação, levando a doenças crônicas na vida adulta [45-48]. Em humanos, de acordo com estudos epidemiológicos, há uma relação inversa entre o baixo peso ao nascimento e a hipertensão arterial sistêmica (HAS) em crianças e adultos [49]. Além disso, Vikse *et al.* demonstraram, em uma coorte histórica, a associação entre baixo peso ao nascimento e doença renal crônica em estágio terminal [47,50]. O presente estudo reporta diversos efeitos deletérios na prole exposta ao TDF durante a gestação. Nossos dados demonstram que o TDF pode estar relacionado ao crescimento intra-uterino retardado (CIUR), com consequentes repercussões na vida adulta.

6.2. Tenofovir e o Crescimento Fetal

Em macacas rhesus, Tarantal *et al.* demonstraram que a administração de altas doses de TDF entre 20 e 150 dias de gestação resultaram em proles com menor peso corporal e menor comprimento cabeça-nádega ao nascimento [6]. Em nosso estudo, encontramos resultados semelhantes em relação aos parâmetros antropométricos da prole exposta ao TDF durante a gestação. Por outro lado, realizamos o seguimento da prole até a idade adulta e relatamos efeitos adversos sistêmicos e renais da exposição intra-uterino ao TDF. Outra diferença importante do nosso estudo refere-se à dose de TDF utilizada. Optamos por administrar uma dose duas vezes superior à dose humana. De acordo com FDA, um acréscimo de seis vezes na dose humana é

necessário para obter a dose equivalente em ratos [51]. Assim, a dose de TDF do nosso estudo pode ser considerada baixa.

Em contraste aos dados previamente expostos, Siberry *et al.* publicaram dados de uma coorte em que foram acompanhadas 2029 crianças expostas à terapia antirretroviral (TARV) durante a gestação. 449 crianças provenientes de mães que receberam TARV contendo TDF foram seguidas até aproximadamente um ano de vida. Os pesquisadores reportaram que o uso de TDF durante a gravidez não foi associado a um risco mais elevado de baixo peso ao nascimento, nem a maior incidência de crianças pequenas para a idade gestacional (PIG). No entanto, foram observados ao término do seguimento menor comprimento para idade e menor perímetro cefálico para a idade (Z-score) nas crianças expostas ao TDF [37]. Uma limitação importante deste estudo foi a variação do tempo de exposição ao TDF durante a gravidez entre as participantes. Além disso, é importante ressaltar que os efeitos deletérios relacionados ao uso do TDF durante a gestação possam estar relacionados não somente ao tempo de exposição, mas também ao período da gestação em que a medicação foi administrada. Neste sentido, existem algumas vantagens em se usar um modelo experimental para este tipo de estudo. Primeiramente, devido ao menor tamanho, às altas capacidades de proliferação, ao curto período de gestação e amamentação e, sobretudo, à facilidade em se administrar medicações durante todo o período gestacional, o rato foi o animal escolhido. Além disso, o rato é um excelente modelo para o estudo de alterações renais, refletindo os processos patológicos observados em rins humanos. É também muito adequado para estudos de programação fetal. Dessa maneira, levantamos a hipótese de que as alterações renais e sistêmicas observadas na prole exposta intra-útero ao TDF possa estar relacionada ao uso regular da medicação durante todo o período gestacional, ou seja, em todas as fases do desenvolvimento fetal.

Em macacos, o TDF apresenta significativo transporte transplacentário, atingindo o pico de nível sérico fetal após 1-3 horas da administração da droga às mães [52]. O TDF atravessa rapidamente a placenta em mulheres grávidas em esquema de HAART, alcançando uma relação de tenofovir entre a mãe e o cordão umbilical de aproximadamente 0,65-1,00 [53]. Em ratos, também foi demonstrado o transporte transplacentário do TDF em ambas as direções (mãe-feto e feto-mãe) [54]. Assim, sugerimos que o TDF atravessa a placenta e pode alterar o ambiente intra-uterino na vida neonatal, induzindo uma resposta permanente no feto e no recém-nascido, o que levaria a uma maior suscetibilidade a doenças posteriores, tais como HAS e hipercolesterolemia.

Ademais, não foi possível associar a restrição do crescimento fetal com quaisquer alterações bioquímicas, hemodinâmicas, nem com aumento do estresse oxidativo ou com a hiperativação do SRAA, nas mães tratadas com TDF durante a gravidez, reforçando a hipótese de um efeito direto da medicação sobre o feto durante a organogênese.

6.3. Crescimento Compensatório (*Catch Up* de Crescimento)

O crescimento compensatório, ou *catch up* de crescimento, é o termo que se refere ao aumento da velocidade de crescimento após longos períodos de privação alimentar, ou em consequência de restrições intrauterinas, como tentativa de alcançar os canais de crescimento normais [55]. Em nosso estudo, observamos restrição no crescimento intrauterino no grupo TDF, identificado através do menor PC e comprimento naso-anal ao nascimento. Em consequência ao CIUR, encontramos um padrão de crescimento pós-natal acelerado a partir do terceiro mês de vida, levando os animais do grupo TDF a atingirem o sexto mês de vida mais pesados em comparação com aqueles do grupo controle. Diversos estudos têm associado o *catch up* de crescimento ao desenvolvimento de obesidade, hipercolesterolemia e aumento de

pressão arterial na vida adulta [56-59]. Dessa forma, os achados de nosso modelo experimental encontram-se de acordo com dados já existentes na literatura. No entanto, é importante ressaltar que o *catch up* de crescimento não deve ser encarado isoladamente como um desencadeante das alterações encontradas na vida adulta, mas sim como um marcador de um processo global, que tem como consequência alterações de estrutura ou de funções orgânicas, ou de ambos, resultando em processos patológicos posteriores [60].

6.4. Hiperativação do Sistema Renina Angiotensina Aldosterona

O SRAA desempenha um papel fundamental na regulação da pressão arterial e do balanço hídrico, especialmente através dos efeitos sistêmicos da angiotensina II e da aldosterona. Entretanto, a ativação inapropriada deste sistema pode representar consequências deletérias ao organismo [61]. Neste sentido, vários estudos reportam o envolvimento do SRAA na patogênese da hipertensão. No estudo de Framingham, os pesquisadores descobriram um aumento de 16% no risco de elevação da pressão arterial e um aumento de 17% no risco de HAS por quartil de aumento no nível plasmático de aldosterona [62]. Reynolds *et al.* demonstraram níveis mais elevados de aldosterona em homens e mulheres com baixo PC ao nascimento e pressão arterial elevada [63]. Além disso, Sahajpal *et al.* encontraram maior expressão renal do AT1r na prole de ratos submetidos à restrição proteica durante a gestação - um modelo animal de programação fetal. Evidência do mesmo estudo reporta que a hiperexpressão de AT1r, associada com o aumento da sensibilidade à angiotensina, pode gerar HAS em ratos “programados” na vida fetal [64]. No presente estudo, verificamos um aumento da expressão renal de componentes do SRAA (angiotensinogênio, ECA, angiotensina II e AT1r), associado aos níveis plasmáticos elevados de aldosterona, nos animais expostos ao TDF durante a gestação,

representando evidência da participação do SRAA renal e sistêmico na patogênese da HAS em nosso modelo experimental.

6.5. Teoria da Redução da Massa de Néfrons

Em 1988, Brenner *et al.* propuseram que a redução do número de néfrons, e consequentemente de toda a superfície glomerular, constitui um importante fator envolvido na fisiopatologia da HAS [65,66]. De acordo com esta teoria, a diminuição da superfície glomerular limitaria a filtração de sódio, resultando na expansão do volume do fluido extracelular e na suscetibilidade ao desenvolvimento de HAS [67]. Além disso, a redução da massa de néfrons seria responsável por uma redução da reserva funcional renal, com consequente limitação à recuperação de função após insultos locais ou sistêmicos, o que explicaria a maior prevalência de doença renal crônica em populações com maior prevalência de baixo peso ao nascimento. Vários modelos animais demonstraram a associação entre baixo peso ao nascimento, redução de número de glomérulos e HAS [68-71]. No entanto, a escassez de néfrons isoladamente é insuficiente para explicar a HAS nos diversos modelos de programação fetal, isto é, pode haver a participação de outros fatores, em conjunto ou independentemente do número de glomérulos, na patogênese da hipertensão “programada” [55,72]. O número final de néfrons em ratos Wistar varia de acordo com a linhagem e cerca de 40.000 glomérulos é considerado normal [73]. Em nosso trabalho, não encontramos redução no número total de néfrons em ambos os grupos estudados. No entanto, aproximadamente 12% do número total de néfrons do grupo TDF não exibiam morfologia normal. A atrofia glomerular (*glomerular shrinkage*) foi a anormalidade mais comumente encontrada. Na nefroesclerose hipertensiva, a lesão glomerular inicial é descrita como focal e compreende o encolhimento do tufo glomerular, a rarefação capilar e a perda de celularidade [74]. Portanto, no momento em que a contagem glomerular foi realizada, os animais já apresentavam hipertensão

arterial documentada há aproximadamente 60 dias, o que explica as alterações estruturais glomerulares compatíveis com nefroesclerose hipertensiva em seu estágio inicial. A ausência de alterações túbulo-intersticiais ou vasculares também pode ser justificada pela precocidade em que o tecido renal foi avaliado.

6.6. Retenção Salina e o Papel dos Transportadores Renais de Sódio

Outro importante mecanismo atribuído à patogênese da hipertensão “programada” é o *upregulation* dos transportadores renais de sódio. A porção espessa da alça de Henle, em conjunto com o túbulo contorcido distal e o ducto coletor, são responsáveis por reabsorver mais de 30% do sódio filtrado pelos glomérulos [75]. Este transporte ocorre graças a transportadores bastante peculiares, respectivamente, NKCC2, NCC e ENaC [76]. O aumento da reabsorção de sódio nestes segmentos do néfron pode levar a algumas formas de hipertensão [72,77,78]. A HAS “programada” descrita em nosso modelo iniciou-se após oito semanas de vida e tornou-se mais pronunciada com a idade. Nossos achados fornecem evidências de que o aumento da expressão dos transportadores renais de sódio possa estar envolvido na geração e na manutenção da HAS na prole exposta ao TDF durante a gestação. Por outro lado, podemos também especular que o aumento da expressão destes transportadores seja uma consequência da redução do número de glomérulos com função intacta. Dessa maneira, o estímulo sugerido para a maior reabsorção de sódio seria o aumento do aporte de sódio aos túbulos distais do néfron devido à hiperfiltração dos néfrons remanescentes, levando ao agravamento da HAS já instalada [79].

Por fim, não encontramos proteinúria ou diferença significativa na função renal no sexto mês de idade entre os grupos estudados, indicando que o aumento dos níveis pressóricos não se correlaciona com alterações da função renal.

6.7. Dislipidemia Programada

Em ratas Wistar, a administração de dieta hipoproteica durante a gestação resultou em proles dislipidêmicas na idade adulta [80]. Em outro modelo experimental, resultados semelhantes foram encontrados na prole proveniente de mães que receberam dieta deficiente de ferro durante o período gestacional [81]. Boney *et al.*, em um estudo de coorte que seguiu 179 crianças até os 11 anos de idade, demonstraram que o baixo peso ao nascimento se correlacionou com maior risco de desenvolver dislipidemia - como um dos componentes da síndrome metabólica - durante a infância [82]. Backer *et al.* também mostraram a associação entre CIUR e aumento do colesterol na vida adulta em um estudo retrospectivo que incluiu 235 participantes. A hipótese levantada pelos autores deste estudo foi que restrição ao crescimento no final da gestação levaria a um déficit no crescimento hepático, com consequências importantes na metabolização do colesterol na vida adulta [83].

O principal responsável pela regulação da homeostase do colesterol é o fígado, onde as enzimas 3-hydroxy-3-metil-glutaril-CoA redutase (HMG-CoAr) e colesterol 7 α -hidroxilase (CYP7A1) catabolizam o colesterol em ácidos biliares. Estas enzimas sofrem maturação durante o desenvolvimento fetal e o período neonatal [84]. Assim, alguns autores sugerem que a atividade das enzimas que participam da síntese e excreção do colesterol possa ser programada durante o desenvolvimento fetal, processo que seria em parte mediado pela alteração epigenética de genes que regulam o metabolismo lipídico [85,86]. A partir do exposto, podemos assumir que os níveis mais elevados de colesterol total na prole TDF ao sexto mês de idade estejam associados ao CIUR, ou seja, a dislipidemia também pode ser considerada um evento programado.

7. Conclusão

O presente estudo é a primeira descrição, através de um modelo experimental, de que a exposição ao TDF durante a gestação pode resultar em HAS e dislipidemia da prole. Nossos resultados também sugerem que a retenção salina pode contribuir na patogênese, bem como para a manutenção, da HAS. Assim, a segurança do uso do TDF durante a gestação permanece incerta e dado o aumento do uso desta medicação na gravidez, faz-se urgente a realização de estudos clínicos com enfoque especial nos efeitos cardiovasculares e renais de crianças e adolescentes expostos ao TDF na gestação.

8. Anexos

8.1.Tabela

Tabela 1 – Parâmetros bioquímicos avaliados nos animais dos grupos tenofovir (TDF) e controle ao 3º e ao 6º mês de idade.

Dados Avaliados	3º Mês			6º Mês		
	Controle (n=9)	TDF (n=9)	p [#]	Controle (n=12)	TDF (n=10)	p [#]
<u>Plasma</u>						
Na ⁺ (mEq/L)	139±2	140±1	0,7	142±3	152±3	0,001
K ⁺ (mEq/L)	5,0±0,2	5,0±0,2	0,8	4,4±0,2	4,5±0,2	0,7
Ca ⁺⁺ (mg/dL)	3,9±0,1	4,1±0,1	0,1	4,4±0,1	4,5±0,2	0,7
P ⁺⁺ (mEq/L)	6,3±0,3	6,0±0,3	0,3	4,3±0,3	4,3±0,4	0,9
Col T (mg/dL)	52±3	54±5	0,7	52±4	72±3	0,002
Aldo (pg/mL)	112±23	256±45	0,01	116±26	247±28	0,002
<u>Urina</u>						
U _{Na} V (mg/24h)	0,86±0,07	0,61±0,07	0,02	0,55±0,07	0,33±0,02	0,02
U _K V (mg/24h)	2,56±0,11	2,30±0,11	0,1	1,67±0,18	1,30±0,05	0,1

Valores expressos em média ± EPM; p[#] TDF vs. controle; Col T: colesterol total; Aldo: aldosterona plasmática; U_{Na}V: sódio urinário; U_KV: potássio urinário.

Tabela 2: Medidas Histo-morfométricas, estimativa estereológica do volume renal e número de glomérulos

Dados Avaliados	Controle (n=8)	TDF (n=5)	p[#]
Volume total renal (mm³)	1528±88	1625±165	0,5
Volume total córtex (mm³)	1067±72	1181±144	0,4
Volume total medula (mm³)	304±24	316±25	0,7
Volume total pelve (mm³)	156±18	129±20	0,3
Nº total corpúsculos renais	38141±3175	43261±2982	0,2
Nº Glomérulos com alteração estrutural[±]	-	4846±1455	-
NvGLOMt (mm⁻³)	36,7±3,5	37,8±2,7	0,8
NvGLOMalt (mm⁻³)	-	4,6±1,7	-
Volume médio do corpúsculo renal* (um³)	305380±45404	276499±34671	0,6
Volume do tufo glomerular* (um³)	229379±37504	220010±31410	0,8

Valores expressos em média ± EPM; p[#] TDF vs. C; [±]néfrons com atrofia glomerular, rarefação capilar e perda de celularidade do tufo glomerular; NvGLOMt: densidade numérica do corpúsculo renal – todos glomérulos; NvGLOMalt: densidade numérica do corpúsculo renal – glomérulos alterados; *volume médio do corpúsculo renal e o volume do tufo glomerular foram avaliados nos glomérulos sem alteração estrutural.

Tabela 3 – Parâmetros bioquímicos e funcionais das mães dos grupos tenofovir (TDF) e controle 48h após o parto.

Dados Avaliados	Controle (n=8)	TDF (n=6)	p[#]
<u>Plasma</u>			
Na⁺ (mEq/L)	143±2	141±3	0,5
K⁺ (mEq/L)	4,6±0,6	3,8±0,2	0,1
Ca⁺⁺ (mg/dL)	3,7±0,5	3,1±0,5	0,2
P⁺⁺ (mEq/L)	5,1±0,6	5,5±0,5	0,6
Aldo (pg/mL)	219±31	324±68	0,1
<u>Urina</u>			
TFG (ml/min)	2,93±0,13	2,78±0,17	0,4
TBARS (nmol/24h)	151±20	158±20	0,8
<u>Estudos Hemodinâmicos</u>			
PAM (mmHg)	128±4	136±5	0,2
FSR (ml/min)	6,0±0,4	5,5±0,1	0,2
RVR (mmHg/ml/min)	21±1	24±1	0,1

Valores expressos em média ± EPM; p[#] TDF vs. controle; Aldo: aldosterona plasmática; TFG: taxa de filtração glomerular avaliada pelo clearance de inulina; TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; PAM: pressão arterial média; FSR: fluxo sanguíneo renal; RVR: resistência vascular renal.

9. Referências bibliográficas

1. UN Joint Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). Global Report: UNAIDS Report on the Global AIDS Epidemic: 2013. November 2013, ISBN 978-92-9253-032-7 [Acesso em 13 de Janeiro de 2014]. Disponível em: http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2013/gr2013/UNAIDS_Global_Report_2013_en.pdf
2. UN Joint Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). Women Out Loud: How Women Living with HIV will Help the World End AIDS. December 2012, ISBN 978-92-9173-995-0. [Acesso em 13 de Janeiro de 2014] Disponível em: <http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/unaids>
3. Paz L. Vigilância epidemiológica da gestante HIV+ no Brasil, desafios para a sua implementação. XVIII Congresso mundial de epidemiologia e VII Congresso brasileiro de epidemiologia; 20-24 Setembro de 2008; Porto Alegre - RS, Brasil. [Acesso em 13 de Janeiro de 2014]. Disponível em: [http://www.epi2008.com.br/apresentacoes/CC_24_09_manha_PDF/Leidjany%20C](http://www.epi2008.com.br/apresentacoes/CC_24_09_manha_PDF/Leidjany%20Costa%20Paz.pdf)
[osta%20Paz.pdf](http://www.epi2008.com.br/apresentacoes/CC_24_09_manha_PDF/Leidjany%20C)
4. Souza Júnior PRB, Szwarcwald CL, Barbosa Júnior A, Carvalho MF, Castilho EA. HIV infection during pregnancy: the Sentinel Surveillance Project, Brazil, 2002. Rev Saude Publica. 2004; 38(6):764-72.
5. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). HIV among Pregnant Women, Infants, and Children in the United States. [Acesso em 13 de Janeiro de 2014]. Disponível em: http://www.cdc.gov/hiv/pdf/risk_WIC.pdf.
6. Tarantal AF, Castillo A, Ekert JE, Bischofberger N, Martin B. Fetal and maternal outcome after administration of Tenofovir to Gravid Rhesus Monkeys (Macaca mulatta). JAIDS. 2002; 29(3):207-20.
7. Kuhn L, Bulterys M. Does Maternal use of Tenofovir during pregnancy affect growth of HIV-exposed uninfected infants? AIDS. 2012; 26(9):1167-9.

8. Fung, HB, Stone EA, Piacenti FJ. Tenofovir disoproxil fumarate: a nucleotide reverse transcriptase inhibitor for the treatment of HIV infection. *Clin Ther.* 2002; 24(10):1515-48.
9. Kearney BP, Flaherty JF, Shah J. Tenofovir disoproxil fumarate: clinical pharmacology and pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet.* 2004; 43(9):595-612
10. Department of Health and Human Services. Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. February 2013. [Acesso em 15 de Janeiro de 2014]. Disponível em: [http:// www.aidsinfo.nih.gov/ContentFiles/AdultandAdolescentGL.pdf](http://www.aidsinfo.nih.gov/ContentFiles/AdultandAdolescentGL.pdf)
11. Sorrell MF, Belongia EA, Costa J, Gareen IF, Grem JL, Inadomi JM, *et al.* National institutes of health consensus development conference statement: management of hepatitis B. *Ann Intern Med.* 2009; 150(2):104-10.
12. Van Rompay KK, Durand-Gasselin L, Brignolo LL, Ray AS, Abel K, Cihlar T *et al.* Chronic administration of tenofovir to rhesus macaques from infancy through adulthood and pregnancy: summary of pharmacokinetics and biological and virological effects. *Antimicrob Agents Chemoth.* 2008; 52(9):3144-60.
13. Rodrigues-Novoa S, Labarga P, D'avolio A, Barreiro P, Albalade M, Vispo E *et al.* Impairment in kidney tubular function in patients receiving tenofovir is associated with higher tenofovir plasma concentrations. *AIDS.* 2010; 24(7):1064-6.
14. Breton G, Alexandre M, Durval X, Prie D, Peytavin G, Leport C *et al.* Tubulopathy consecutive to tenofovir-containing antiretroviral therapy in two patients infected with human immunodeficiency virus-1. *Scand J Infect Dis.* 2003; 36(6-7):527-8.
15. Karras A, Lafaurie M, Furco A, Bourgarit A, Droz D, Sereni D *et al.* Tenofovir-related nephrotoxicity in human immunodeficiency virus-infected patients: three cases of renal failure, Fanconi syndrome and nephrogenic diabetes insipidus. *Clin Infect Dis.* 2003; 36(8):1070-3.

16. Rodrigues-Novoa S, Labarga P, Soliano V. Pharmacogenetics of tenofovir treatment. *Pharmacogenomics*. 2009; 10(10):1675-85.
17. Kiser JJ, Aquilante CL, Anderson PL, King TM, Carten ML, Fletcher CV. Clinical and genetic determinants of intracellular tenofovir diphosphate concentrations in HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2008; 47(3):298-303.
18. Izzedine H, Hulot JS, Villard E, Goyenvallé C, Dominguez S, Ghosn J *et al*. Association between ABCC2 gene haplotypes and tenofovir-induced proximal tubulopathy. *J Infect Dis*. 2006; 194(11):1481-91.
19. Moyle G. Mechanisms of HIV and nucleoside reverse transcriptase inhibitor injury to mitochondria. *Antivir Ther*. 2005; 10(S2):M47-M52.
20. Biesecker G, Karimi S, Desjardins J, Meyer D, Abbott B, Bendele R *et al*. Evaluation of mitochondrial DNA content and enzyme levels in tenofovir DF-treated rats, rhesus monkeys and woodchucks. *Antiviral Res*. 2003; 58(3): 217-25.
21. Herlitz LC, Mohan S, Stokes MB, Radhakrishnan J, D'Agati VD, Markowitz GS. Tenofovir nephrotoxicity: acute tubular necrosis with distinctive clinical, pathological, and mitochondrial abnormalities. *Kidney Int*. 2010; 78(11):1171-7.
22. Côté HC, Magil AB, Harris M, Scarth BJ, Gadawski I, Wang N *et al*. Exploring mitochondrial nephrotoxicity as a potential mechanism of kidney dysfunction among HIV-infected patients on highly active antiretroviral therapy. *Antivir Ther*. 2006; 11(1):79-86.
23. Maggi P, Montinaro V, Bellacosa C, Pietanza S, Volpe A, Graziano G *et al*. Early markers of tubular dysfunction in antiretroviral-experienced HIV-infected patients treated with tenofovir versus abacavir. *AIDS Patient Care STDS*. 2012; 26(1):5-11.
24. Libório AB, Andrade L, Pereira LV, Sanches TR, Shimizu MH, Seguro AC. Rosiglitazone reverses tenofovir-induced nephrotoxicity. *Kidney Int*. 2008; 74(7):910-8.

25. de la Prada FJ, Prados AM, Tugores A, Uriol M, Saus C, Morey A. Acute renal failure and proximal renal tubular dysfunction in a patient with acquired immunodeficiency syndrome treated with tenofovir. *Nefrologia*. 2006; 26(5):626-30.
26. Peyriere H, Reynes J, Rouanet I, Daniel N, de Boever CM, Mauboussin JM et al. Renal tubular dysfunction associated with tenofovir therapy: report of 7 cases. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2004; 35(3):269-73.
27. Guan Y. Peroxisome proliferator-activated receptor family and its relationship to renal complications of the metabolic syndrome. *J Am Soc Nephrol*. 2004; 15(11): 2801-15.
28. Fernandez BF, Ferrer AM, Sanz AB, Sanchez MDN, Izquierdo MC, Poveda J et al. Tenofovir Nephrotoxicity: 2011 update. *AIDS Res and Treatment*. [periódico na Internet]. 2011 Jun [acesso em 14 de Janeiro de 2014] [11 páginas]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3119412/pdf/ART2011-354908.pdf>
29. Hall AM. Update on tenofovir toxicity in the kidney. *Pediatr Nephrol*. 2012; 28(7):1011-23
30. _____. Recomendações para Profilaxia da Transmissão Vertical do HIV e Terapia Antirretroviral em Gestantes. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, AIDS e Hepatite virais. Brasília, 2010. Série manuais, 46. [Acesso em 14 de Fevereiro de 2014]. Disponível em: http://www.aids.gov.br/sites/default/files/consenso_gestantes_2010_vf.pdf
31. WHO. Antiretroviral drugs for treating pregnant women and preventing HIV infection in infants. Recommendations for a public health approach (2010 version). [Acesso em 15 de Janeiro de 2014]. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241599818_eng.pdf

32. Neumanova Z, Cervený L, Cecková M, Staud F. Interactions of tenofovir and tenofovir disoproxil fumarate with drug efflux transporters ABCB1, ABCG2, and ABCC2; role in transport across the placenta. *AIDS*. 2014; 28(1):9-17.
33. Townsend CL, Cortina-Borja M, Peckham CS, Tookey PA. Antiretroviral therapy and premature delivery in diagnosed HIV-infected women in the United Kingdom and Ireland. *AIDS*. 2007; 21(8):1019-26.
34. Tuomala RE, Shapiro DE, Mofenson LM, Bryson Y, Culnane M, Hughes MD *et al*. Antiretroviral therapy during pregnancy and the risk of an adverse outcome. *N Engl J Med*. 2002; 346(24):1863-70.
35. Martin F, Taylor GP. Increased rates of preterm delivery are associated with the initiation of highly active antiretroviral therapy during pregnancy: a single-center cohort study. *J Infect Dis*. 2007; 196(4):558-61.
36. Van Rompay KK, Brignolo LL, Meyer DJ, Jerome C, Tarara R, Spinner A *et al*. Biological effects of short-term or prolonged administration of 9-[2-(phosphonomethoxy)propyl]adenine (tenofovir) to newborn and infant rhesus macaques. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48(5):1469-87.
37. Siberry GK, Williams PL, Mendez H, Seage GR 3rd, Jacobson DL, Hazra R *et al*. Safety of tenofovir use during pregnancy: early growth outcomes in HIV-exposed uninfected infants. *AIDS*. 2012; 26(9):1151-9.
38. Cartilha de orientação de descarte de resíduo no sistema FMUSP-HC. [Acesso em 14 de Fevereiro de 2014]. Disponível em: http://medicina.fm.usp.br/gd/docs/grss_2_cartilha.pdf
39. Cruz-Orive LM, Weibel ER. Recent stereological methods for cell biology: a brief survey. *Am J Physiol*. 1990; 258:148–56.
40. Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Møller A, Nielsen K *et al*. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*. 1988; 96(5):379–94.

41. Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N *et al.* The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*. 1988; 96(10):857–81.
42. Gundersen HJ, Jensen EB. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc*. 1987; 147(Pt3):229–63.
43. Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*. 1981; 112(2):195-203.
44. Dötsch J, Plank C, Amann K. Fetal programming of renal function. *Pediatr Nephrol*. 2012; 27(4):513-20.
45. Baum M. Role of the kidney in the prenatal and early postnatal programming of hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010; 298(2):F235-47.
46. Luyckx VA, Bertram JF, Brenner BM, Fall C, Hoy WE, Ozanne SE, *et al.* Effect of fetal and child health on kidney development and long-term risk of hypertension and kidney disease. *Lancet*. 2013; 382(9888):273-83.
47. Vikse BE, Irgens LM, Leivestad T, Hallan S, Iversen BM. Low birth weight increases risk for end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol*. 2008; 19(1):151-7.
48. Khalil CA, Travert F, Fetita S, Rouzet F, Porcher R, Riveline JP, *et al.* Fetal exposure to maternal type 1 diabetes is associated with renal dysfunction at adult age. *Diabetes*. 2010; 59(10):2631-6.
49. Luyckx VA, Brenner BM. Low birth weight, nephron number, and kidney disease. *Kidney Int Suppl*. 2005; (97):S68-77.
50. HersHKovitz D, Burbea Z, Skorecki K, Brenner BM. Fetal programming of adult kidney disease: cellular and molecular mechanisms. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2007; 2(2):334-42.

51. Sharma V, McNeill JH. To scale or not to scale: the principles of dose extrapolation. *Br J Pharmacol.* 2009; 157(6):907-21.
52. Tarantal AF, Marthas ML, Shaw JP, Cundy K, Bischofberger N. Administration of 9-[2-(R)-(phosphonomethoxy)propyl]adenine (PMPA) to gravid and infant rhesus macaques (*Macaca mulatta*): safety and efficacy studies. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1999; 20(4):323-33.
53. Foster C, Lyall H, Olmscheid B, Pearce G, Zhang S, Gibb DM. Tenofovir disoproxil fumarate in pregnancy and prevention of mother-to-child transmission of HIV-1: is it time to move on from zidovudine? *HIV Med.* 2009; 10(7):397-406.
54. Neumanova Z, Cervený L, Ceckova M, Staud F. Interactions of tenofovir and tenofovir disoproxil fumarate with drug efflux transporters ABCB1, ABCG2, and ABCC2; role in transport across the placenta. *AIDS* 2014; 28(1):9-17.
55. Luyckx VA, Brenner BM. The clinical importance of nephron mass. *J Am Soc Nephrol.* 2010; 21(6):898-910.
56. Ben-Shlomo Y, McCarthy A, Hughes R, Tilling K, Davies D, Smith GD. Immediate postnatal growth is associated with blood pressure in young adulthood: the Barry's Child Growth Study. *Hypertension.* 2008; 52(4):638–44.
57. Hemachandra AH, Howards PP, Furth SL, Klebanoff MA. Birth weight, postnatal growth, and risk for high blood pressure at 7 years of age: results from the Collaborative Perinatal Project. *Pediatrics.* 2007; 119(6):e1264–70.
58. Lopes KL, Furukawa LN, de Oliveira IB, Dolnikoff MS, Heimann JC. Perinatal salt restriction: a new pathway to programming adiposity indices in adult female Wistar rats. *Life Sci.* 2008; 82(13-14):728-32.
59. Vidonho AF Jr, da Silva AA, Catanozi S, Rocha JC, Beutel A, Carillo BA, et al. Perinatal salt restriction: a new pathway to programming insulin resistance and dyslipidemia in adult Wistar rats. *Pediatr Res.* 2004; 56(6):842-8.

60. Nuyt AM, Alexander BT. Developmental programming and hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2009; 18(2):144-52.
61. Grigore D, Ojeda NB, Robertson EB, Dawson AS, Huffman CA, Bourassa EA *et al*. Placental insufficiency results in temporal alterations in the renin angiotensin system in male hypertensive growth restricted offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007; 293(2):R804-11.
62. Vasan RS, Evans JC, Larson MG, Wilson PW, Meigs JB, Rifai N, *et al*. Serum aldosterone and the incidence of hypertension in nonhypertensive persons. *N Engl J Med*. 2004; 351(1):33-41.
63. Reynolds RM, Walker BR, Phillips DI, Dennison EM, Fraser R, Mackenzie SM, *et al*. Programming of hypertension: associations of plasma aldosterone in adult men and women with birth weight, cortisol, and blood pressure. *Hypertension*. 2009; 53(6):932-6.
64. Sahajpal V, Ashton N. Increased glomerular angiotensin II binding in rats exposed to a maternal low protein diet in utero. *J Physiol*. 2005; 563(Pt 1):193-201.
65. Brenner BM, Garcia DL, Anderson S. Glomeruli and blood pressure: Less of one, more the other? *Am J Hypertens*. 1988; 1:335-47.
66. Brenner BM, Chertow GM. Congenital oligonephropathy and the etiology of adult hypertension and progressive renal injury. *Am J Kidney Dis*. 1994; 23(2):171-5.
67. Celsi G, Kistner A, Aizman R, Eklöf AC, Ceccatelli S, de Santiago A, *et al*. Prenatal dexamethasone causes oligonephronia, sodium retention, and higher blood pressure in the offspring. *Pediatr Res*. 1998; 44(3):317-22.
68. Gilbert T, Lelievre-Pegorier M, Merlet-Benichou C. Long-term effects of mild oligonephronia induced in utero by gentamicin in the rat. *Pediatr Res*. 1991; 30(5): 450–6.
69. Langley-Evans SC. Intrauterine programming of hypertension in the rat: Nutrient interactions. *Comp Biochem Physiol A Physiol*. 1996; 114(4): 327–33.

70. Merlet-Benichou C. Influence of fetal environment on kidney development. *Int J Dev Biol.* 1999; 43(5):453–6.
71. Ortiz LA, Quan A, Weinberg A, Baum M. Effect of prenatal dexamethasone on rat renal development. *Kidney Int.* 2001; 59(5):1663–9.
72. Manning J, Beutler K, Knepper MA, Vehaskari VM. Upregulation of renal BSC1 and TSC in prenatally programmed hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2002; 283(1):F202-6.
73. Tucker MJ. Diseases of the Wistar rat. Taylor & Francis Limited. 1^a ed. London; 1997.
74. Anderson S. Pathogenesis of nephrosclerosis and chronic kidney disease. “In”: Izzo JL, Sica DA, Black HR (eds.). *Hypertension Primer*, 4^a ed. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia; 2008. Pg.: 222-8.
75. Schiessl IM, Rosenauer A, Kattler V, Minuth WW, Oppermann M, Castrop H. Dietary salt intake modulates differential splicing of the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2013; 305(8):F1139-48.
76. Seguro AC, Magaldi AJB, Helou CMB, Malnic G, Zatz R. Processamento de água e eletrólitos pelos túbulos renais. “In”: Zatz R (editor), Seguro AC, Malnic G (co-editores). *Bases Fisiológicas da Nefrologia*. Editora Atheneu: São Paulo; 2012. Pg.: 45-84.
77. Gonzalez-Vicente A, Garvin JL. Angiotensin II-induced hypertension increases plasma membrane Na pump activity by enhancing Na entry in rat thick ascending limbs. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2013; 305(9):F1306-14.
78. Cheng CJ, Lozano G, Baum M. Prenatal programming of rat cortical collecting tubule sodium transport. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012; 302:F674-678.
79. Kwon TH, Frøkiaer J, Fernandez-Llama P, Maunsbach AB, Knepper MA, Nielsen S. Altered expression of Na transporters NHE-3, NaPi-II, Na-K-ATPase, BSC-1, and TSC in CRF rat kidneys. *Am J Physiol Renal Physiol.* 1999; 277:F257-70.

80. Sohi G, Marchand K, Revesz A, Arany E, Hardy DB. Maternal protein restriction elevates cholesterol in adult rat offspring due to repressive changes in histone modifications at the cholesterol 7 α -hydroxylase promoter. *Mol Endocrinol*. 2011; 25(5):785-98.
81. Zhang J, Lewis RM, Wang C, Hales N, Byrne CD. Maternal dietary iron restriction modulates hepatic lipid metabolism in the fetuses. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005; 288(1):R104-11.
82. Boney CM, Verma A, Tucker R, Vohr BR. Metabolic syndrome in childhood: association with birth weight, maternal obesity, and gestational diabetes mellitus. *Pediatrics*. 2005; 115(3):e290-6.
83. Barker DJ, Martyn CN, Osmond C, Hales CN, Fall CH. Growth in utero and serum cholesterol concentrations in adult life. *BMJ*. 1993; 307(6918):1524-7.
84. Innis SM. Influence of maternal cholestyramine treatment on cholesterol and bile acid metabolism in adult offspring. *J Nutr*. 1983; 113(12):2464-70.
85. Liu X, Qi Y, Tian B, Chen D, Gao H, Xi C *et al*. Maternal protein restriction induces alterations in hepatic tumor necrosis factor- α /CYP7A1 signaling and disorders regulation of cholesterol metabolism in the adult rat offspring. *J Clin Biochem Nutr*. 2014; 55(1):40-7.
86. Erhuma A, Salter AM, Sculley DV, Langley-Evans SC, Bennett AJ. Prenatal exposure to a low-protein diet programs disordered regulation of lipid metabolism in the aging rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007; 292(6):E1702-14.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

A CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de **13/03/2013**, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **071/13** intitulado: **“EFEITOS MATERNOS E FETAIS DECORRENTES DA ADMINISTRAÇÃO DE TENOFOVIR DURANTE A GESTAÇÃO”** que utilizará **100** animais da espécie **Ratos Wistar fêmeas e machos**, apresentado pelo **Departamento de CLÍNICA MÉDICA**

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Antonio Carlos Seguro

Pesquisador (a) Executante: Pedro Henrique França Gois

CEP-FMUSP, 14 de Março de 2013.

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

MANUSCRITO SUBMETIDO

TENOFOVIR DURING PREGNANCY IN RATS: A NOVEL PATHWAY FOR PROGRAMMED HYPERTENSION IN THE OFFSPRING

Pedro Henrique França Gois¹, M.D.; Daniele Canale¹, M.Sc., Ph.D.; Weverton Machado Luchi¹, M.D.; Rildo Aparecido Volpini¹, M.Sc., Ph.D; Mariana Matera Veras², Ph.D.; Natália de Souza Xavier Costa², B.S.; Maria Heloisa Massola Shimizu¹, M.Sc., Ph.D.; Antonio Carlos Seguro¹, M.D., Ph.D.

¹ **Laboratory for Medical Research – LIM12, Nephrology Department, University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil**

² **Laboratory of Experimental Air Pollution – LIM05, Department of Pathology, University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil**

Corresponding Author

Dr. Pedro Henrique França Gois

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Avenida Dr. Arnaldo, 455, Sala 3310, Pinheiros, CEP: 01246-930, São Paulo - SP, Brazil. Tel./FAX. +55 11 30617281

E.mail: pedrogoismd@usp.br

Running head: Tenofovir during pregnancy: effects on offspring

SYNOPSIS

Objectives: To evaluate the occurrence of systemic and renal abnormalities in the offspring of Wistar rats exposed to tenofovir disoproxil fumarate (TDF) during pregnancy.

Methods: Female Wistar rats received a standard diet, with or without addition of TDF (100 mg/Kg diet), one week before mating and during pregnancy. Offspring from the TDF group were placed with an untreated foster mother during breastfeeding and compared with offspring from rats maintained on a standard diet during mating and pregnancy (control). Control and TDF were followed up at three and six months of age. Analyzed data: monthly body weight and systolic blood pressure (SBP), glomerular counting, renal function, biochemical parameters, immunohistochemistry for angiotensin II and renal tissue immunoblotting for renin angiotensin aldosterone system (RAAS) and renal sodium transporters.

Results: TDF offspring showed lower birth weight compared with the control group. After the third month, growth among the TDF group experienced a rapid catch-up. SBP increased progressively after the second month of age in the TDF group. The nephron number did not differ between groups, however, TDF group showed glomerular structural changes. Plasma aldosterone was higher in the TDF group, associated with a significant increase in renal expression of RAAS. The TDF rats showed upregulation of renal sodium transporters and consequently lower urinary sodium excretion.

Conclusions: This is the first demonstration using an experimental model that maternal exposure to TDF during gestation results in over activation of RAAS, upregulation of renal sodium transporters and hypertension of the offspring.

Keywords: tenofovir; pregnancy; hypertension; HIV; AIDS; hepatitis B

INTRODUCTION

Human immunodeficiency virus (HIV) infection is a public health problem that affects approximately 35 million people worldwide, half of them women.¹ Some 8,700 HIV-positive women give birth each year and more than 4,000 children in the United States are exposed in utero to several antiretroviral drugs.²

Tenofovir disoproxil fumarate (TDF) is an orally bioavailable prodrug form of tenofovir, a nucleotide analog of adenosine monophosphate.³ Currently, TDF is considered a first-line medication in the treatment of acquired immune deficiency syndrome (AIDS), among several combinations in highly active antiretroviral therapy (HAART), and in 2008, it was also approved for the treatment of chronic hepatitis B in adults.⁴

Data from the Antiretroviral Pregnancy Registry showed that 3,276 pregnancies from January 1989 through January 2013 were exposed to TDF, of which 2,313 in the first trimester.⁵ Furthermore, despite being classified as a pregnancy category B drug, TDF has integrated recent WHO guidelines for prophylaxis of HIV-vertical transmission.^{6,7}

A number of adverse events have been associated with the use of ARV during pregnancy, such as premature birth, spontaneous abortion, and low birth weight.⁸⁻¹⁰ In pregnant rhesus monkeys, administration of TDF at high doses in the first trimester resulted in lower crown-rump length, lower body weight, and smaller adrenal glands compared with tenofovir-unexposed control monkeys.¹¹ Additionally, high-dose tenofovir administration to infant macaques was associated with infant growth restriction.¹²

TDF has also been associated with nephrotoxicity.¹³⁻¹⁶ However, there are no currently published data on the renal adverse effects of TDF regimens during gestation. To date, caution in the use of TDF during pregnancy has been recommended, based on potential deleterious effects on fetal growth and bone mineralization.¹⁷ The aim of this study is to evaluate the occurrence of systemic and renal abnormalities in the

offspring exposed to TDF during gestation.

MATERIALS AND METHODS

All experimental procedures were approved by the local research ethics committee (CEP-FMUSP: “Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo”, process no. 071/13) and developed in strict conformity with local institutional guidelines and with well-established international standards for the manipulation and care of laboratory animals.

Animals and experimental protocol

Female Wistar rats with a mean body weight (BW) of 231 ± 22 g were obtained from the animal facilities of the University of São Paulo, School of Medicine, housed in standard cages, and given ad libitum access to water. Animals were allocated to be fed with either a standard diet (Nuvilab CR-1, Curitiba-PR, Brazil) or a standard diet with the addition of TDF (100 mg/Kg food) one week before mating and during pregnancy ($n=7$ for TDF and $n=8$ for control group). Water and food intake were measured daily during pregnancy. Females were allowed to mate with mature males (in a proportion of 3 females : 1 male) for 21 days. Soon after delivery, each Wistar dam nursed 6 male pups to minimize variation in nutrition of the pups during suckling. Offspring from TDF were placed with an untreated foster mother during the breastfeeding period (25 days) in order to simulate the recommendation that HIV-infected women should not breastfeed. Offspring from TDF and offspring from rats maintained with a standard diet during mating and pregnancy were followed up at three months ($n=9$ for each group) and six months of age ($n=10$ for TDF and $n=12$ for control). Body weight was evaluated at birth and weekly until the end of the study. Naso-anal length was measured at birth and at one and two weeks of age. Figure 1a illustrates the experimental protocol.

Metabolic cage studies and analysis of urine samples

On the day before inulin clearance studies, animals (offspring from TDF and

control groups) were moved to metabolic cages (one rat per cage), maintained on a 12-h light/dark cycle, and given free access to drinking water. Rats were acclimated to the housing conditions for one day before the experimental procedures, which began with collection of 24-h urine samples. The volume of each 24-h urine sample was measured gravimetrically. Urine samples were centrifuged in aliquots to remove suspended material, and supernatants were analyzed.

Blood pressure measurements

Systolic arterial pressure was measured monthly at four weeks of age in conscious rats by the indirect tail-cuff method using an electro-sphygmomanometer (RTBP 2000, Kent Scientific Corporation, Torrington, CT). Rats were placed in a darkened room and preheated to 39°C for 10 minutes. A suitably sized cuff was placed over the tail and inflated to 200 mmHg. Changes in blood flow were detected by a Doppler ultrasonic flowmeter. There were 6-8 blood pressure readings, with a one-minute interval between them, and the mean was used as the blood pressure for that rat.

Morphometric measurements and stereological estimation of kidney volume, glomerular number, and glomerular volume

At three months of age, the left kidney was flushed with 10% formalin in order to carry out histomorphological evaluation (n=5 for TDF and n=8 for control group). The left kidney was cleaned of connective tissue and fixed in 10% formalin. The total volume of the kidney (VT_{kidney}) was estimated macroscopically using the Cavalieri principle, and these fixed kidneys were sectioned transversally into 4 mm slices (n=7-8 slices per kidney).¹⁸ A point test system ($a(p)=7.84\text{mm}^2$) printed on an acetate sheet was superimposed on each slice, and the number of points falling on the kidney was counted. The total volume of the kidney was estimated using the following formula (1):

$$(1) VT_{\text{kidney}} = \sum ptK * a(p) * T,$$

where $\sum ptK$ is the sum of points falling on the kidney in all sections, $a(p)$ is the point reference area, and T is the slice thickness ($T=4$ mm).

All slices were then processed for paraffin embedding, and for each slice a block was prepared. Blocks were sectioned into 5 μm thickness sections, with the aid of a rotative microtome, and two random pairs of sections 400 μm distant from each other were collected on glass slides and stained with hematoxylin and eosin (HE). Also, from these blocks, two physical dissector pairs were prepared, and the distance between the section of the pair was 20 μm (h , dissector high). A total of 14-16 pairs of section were prepared per kidney.

Major renal compartment volume fractions (pelvis, cortex, and medulla) were estimated, using one of the sections of all pairs, by the point counting method.¹⁹ Slides were observed using 2.5x objective lens in order to view each entire slide, a test grid (area per point 1.712 mm^2 on the specimen scale) was superimposed on sections, and points falling on each compartment and on the entire kidney were counted. Volume fractions (V_v) of compartments within kidneys were estimated using the following equation (2):

$$(2) \text{Est } VV \sum P_{\text{comp}} = \sum P_{\text{kidney}},$$

where $\sum P_{\text{comp}}$ and $\sum P_{\text{kidney}}$ were summed over all fields and sections from each kidney.

Subsequently, the total volume of each compartment (VT_{comp}) within a kidney was estimated by multiplying its volume fraction (V_v) by the corresponding kidney volume (VT_{kidney}).

The same procedure was applied to estimate the volume and volume fractions of renal corpuscle and glomeruli on random selected fields of view ($n=60$). For this analysis, random fields of view sampled on the renal cortex were observed under a 20x objective lens, and a point test system with an area per point of 1000 μm^2 on the

specimen scale was used.

The CAST system (Visionpharm, Denmark) software was used to generate the test systems and do the counts.

The number of glomeruli was estimated using physical dissectors and counted in fields within the renal cortex that were selected using a systematic uniform random scheme.^{20,21} To count glomeruli, regions of interest in both sections (pair) were found and aligned, an unbiased counting frame was superimposed [$a(f) = 2.63 \text{ mm}^2$] on both sections, and those glomeruli sampled by the frame applied on the first section that were not present in the corresponding frame in the second section were counted (Q). To double the efficiency, those glomeruli in the frame of the second section that were not present in the frame of the first section were then counted (Q-1). Using the following formulas, the number density (3) and the total number of glomeruli (4) were estimated. Glomeruli presenting histopathological changes were counted differentially (Qa, Qa-1).

$$(3) \text{ Nvglom} = (\sum Q + \sum Q-1 + \sum Qa + \sum Qa-1) / (2 * \text{ndis} * \text{Vdis})$$

$$(4) \text{ Nglom} = \text{Nvglom} * \text{Vcortex},$$

where Q and Q-1 are the sum of glomeruli counted on all dissector pairs, ndis is the number of dissectors counted per kidney, and Vdis is the volume of the dissector ($\text{Vdis} = a(f) * \text{dissector high}$).

The average volume of glomeruli was estimated as a ratio between the total volume of glomeruli estimated by point counting and the total number of glomeruli estimated by physical dissector.

Determination of renal function

To determine the glomerular filtration rate (GFR), inulin clearance studies were conducted at three and six months of age. On the day of the experiment, animals were anesthetized intraperitoneally with sodium thiopental (50 mg/kg BW). The trachea was

cannulated with a PE-240 catheter, and spontaneous breathing was maintained. To control mean arterial pressure and allow blood sampling, a PE-60 catheter was inserted into the right carotid artery. For infusion of inulin and fluids, another PE-60 catheter was inserted into the left jugular vein. In order to collect urine samples, a suprapubic incision was made, and the urinary bladder was cannulated with a PE-240 catheter. After surgical procedure, a loading dose of inulin (100 mg/kg BW diluted in 0.9% saline) was administered through the jugular vein. Subsequently, a constant inulin infusion (10 mg/kg BW in 0.9% saline) was started and was continued at 0.04 ml/minute throughout the experiment. Blood samples and three urine samples were obtained at the beginning and at the end of the experiment. Blood and urine inulin were determined using the anthrone method. GFR data are expressed as ml/min.

Evaluation of biochemical parameters

Plasma and urinary sodium and potassium were measured by flame photometry (CELM, model FC280, São Paulo, SP, Brazil). Serum calcium and phosphate were determined with specific electrodes (ABL800Flex – Radiometer, Brønshøj, Denmark). The enzymatic colorimetric method (Labtest, Lagoa Santa, Brazil) was used to quantify levels of serum total cholesterol. Serum aldosterone was measured by radioimmunoassay, using a commercially available kit (Immunotech SAS, Marseille, France). Biochemical data were evaluated in offspring at three and six months of age, and the maternal evaluation was performed 48h after the delivery.

Tissue sample collection and preparation

At the end of inulin clearance studies (at six months of age), the organs were perfused with PBS solution (0.15 M NaCl and 0.01 M sodium phosphate buffer, pH 7.4). The right kidney was removed and frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for assessment of angiotensinogen, angiotensin II receptor type 1 (AT1r), angiotensin-

converting enzyme (ACE), renin, Na-K-2Cl (NKCC2) cotransporter, Na-Cl (NCC) cotransporter and epithelial sodium channel (ENaC, α , β and γ subunits) protein expression.

Total protein isolation

Kidney sections were homogenized in an ice-cold isolation solution (200 mmol/l mannitol, 80 mmol/l HEPES, 41 mmol/l KOH, pH 7.5) containing a protease inhibitor cocktail (Sigma, St. Louis, MO, USA), using a Teflon-pestle glass homogenizer (Schmidt and Co., Frankfurt am Main, Germany). The homogenates were centrifuged at low speed (4,000 rpm) for 30 min at 4°C to remove nuclei and cell debris. Pellets were suspended in isolation solution with protease inhibitors. Protein concentrations were determined using the Bradford assay method (Bio-Rad Protein Assay Kit; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Electrophoresis and immunoblotting

Kidney samples were run on 8% (for NKCC2, NCC and ACE) and 10% (for ENaC, angiotensinogen and AT1r) polyacrylamide minigels. After transfer by electroelution to nitrocellulose membranes (PolyScreen, PVDF Transfer, Life Science Products, Boston, MA, USA), blots were blocked with 5% skim milk and 0.1% Tween 20 in TBS for 1 hour. Blots were then incubated overnight with an anti-angiotensinogen (1:1,000), anti-AT1r (1:500), anti-ACE (1:1,000), anti-NKCC2 (1:2,000), anti-NCC (1:500), anti- α ENaC (1:500), anti- β ENaC (1:200) and anti- γ ENaC (1:500) antibodies. The labeling was visualized with a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (anti-rabbit IgG, diluted 1:2000 or anti-goat IgG diluted 1:10,000), using the enhanced chemiluminescence detection system ECL Western blotting detection reagents (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). The specific polyclonal antibody were obtained from: AT1r, angiotensinogen, ACE and β ENaC (Santa Cruz Biotechnology,

CA, USA); NKCC2, α ENaC and γ ENaC (Millipore, CA, USA); and NCC (Stressmarq, Victoria BC, Canada). As a loading control, blots were incubated with a α -actin antibody (Santa Cruz, CA, USA; 1:2,000 with anti-goat 1:10,000).

Quantitation of renal protein levels

The images were obtained using the chemiluminescence image system Alliance 4.2 (Uvitech, Cambridge, UK). The target protein bands were normalized through evaluation of densitometric α -actin protein abundance.

Immunohistochemistry studies

Four- μ m sections of kidney were incubated overnight at room temperature (1:2,000) with a polyclonal primary antibody anti-angiotensin II (Peninsula Laboratories, Inc., EUA). The reaction product was detected with an avidin-biotin-peroxidase complex (Vector Laboratories, Burlingame, CA). The color reaction was developed with 3,3-diaminobenzidine (Sigma), and the material was counterstained with Harris hematoxilin, dehydrated, and mounted.

To evaluate the immunostaining for angiotensin II, the proportions of positive areas in tissue sections, determined by the limit color, were obtained by image analysis with Image-Pro Plus software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) on a computer connected to a digital camera and coupled to a microscope (Axioskop 40, Carl Zeiss, Göttingen, Germany). Volume proportion is expressed as the area of the tissue section testing positive for angiotensin II divided by the total area of the section. Results were expressed as percentages.

Maternal evaluation

We have also conducted series of experiments (inulin clearance, measurement of arterial pressure, renal blood flow and renal vascular resistance, metabolic cage

studies, evaluation of biochemical parameters and urinary thiobarbituric acid reactive substances - TBARS) with mothers fed with standard diet (control mothers, n=8) or standard diet with TDF (TDF mothers, n=6) 48h after the delivery.

Hemodynamic studies

To access the mean arterial pressure (MAP) and allow blood sampling, a PE-60 catheter was inserted into the right carotid artery during the inulin clearance studies. MAP was assessed using Biopac Systems Inc MP100 (Santa Barbara, CA, USA).

After the inulin clearance experiment, a midline incision was made to measure the renal blood flow (RBF). We carefully dissected the left renal pedicle and isolated the renal artery, taking precautions to avoid disturbing the renal nerves. An ultrasonic flow probe was placed around the exposed renal artery. RBF was measured using an ultrasonic flowmeter (T402; Transonic Systems, Bethesda, MD, USA) and is expressed as ml/min. Renal vascular resistance (RVR) was calculated by dividing the blood pressure by RBF and is expressed as mmHg/ml/min.

Assessment of reactive oxygen metabolites

Urinary levels of TBARS, which are markers of lipid peroxidation, were determined using the thiobarbituric acid assay. In brief, a 0.2 ml serum or urinary sample was diluted in 0.8 ml of distilled water. Immediately thereafter, 1 ml of 17.5% trichloroacetic acid was added. Following the addition of 1 ml of 0.6% thiobarbituric acid, pH 2, the sample was placed in a boiling water bath for 15 min, after which it was allowed to cool. Subsequently, 1 ml of 70% trichloroacetic acid was added, and the mixture was incubated for 20 min. The sample was then centrifuged for 15 min at 2,000 rpm. The optical density of the supernatant was read at 534 nm against a reagent blank using a spectrophotometer. The quantity of TBARS was calculated using a molar extinction coefficient of $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Statistical analysis

All quantitative data are expressed as mean $\pm$ SEM. The unpaired t-test was employed to compare the means of two groups of data. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant. Data were analyzed using GraphPad Prism software 5.0.

RESULTS

TDF offspring showed a significant reduction in birth weight (BW) (6.18 ± 0.48 vs. control 6.55 ± 0.58 g, $p=0.0006$) (fig. 1b). This reduction in BW was maintained up to the third month of age, after which animals in the TDF group experienced rapid catch-up growth, reaching the sixth month heavier than the control group (fig. 1c). Naso-anal length was also reduced in the TDF group compared with controls at birth (4.78 ± 0.02 vs. control 4.93 ± 0.03 cm, $p=0.009$), one week (7.22 ± 0.05 vs. control 7.78 ± 0.07 cm, $p=0.001$) and two weeks of age (8.95 ± 0.23 vs. control 10.13 ± 0.08 cm, $p<0.0001$). No differences were found in litter size at birth between the groups. In order to rule out the influence of the adoption process in growth restriction of the TDF offspring, soon after delivery we carried out an exchange of offspring from two control mothers during the breastfeeding period. Growth parameters did not differ between the control group and offspring from the control group with foster mother. However, both control groups maintained the differences with the TDF group.

Blood pressure data

As seen in figure 2, systolic arterial pressure increased after 30 days of age in TDF (138 ± 3 vs. control 111 ± 2 mmHg, $p<0.001$) and rose progressively until six months of follow-up (155 ± 2 mmHg vs. control 119 ± 2 , $p<0.0001$).

Volume and volume densities of kidney compartments and number of glomeruli

Total volume of the kidney (TDF: $1,625 \pm 165$ vs. control: $1,528 \pm 88$ mm³, $p=0.5$), total volume of the renal cortex (TDF: $1,181 \pm 144$ vs. control: $1,067 \pm 72$ mm³, $p=0.4$), volume of the renal medulla (TDF: 316 ± 25 vs. control: 304 ± 24 mm³, $p=0.7$), and total number of renal corpuscles (TDF: $43,261 \pm 2,982$ vs. control: $38,141 \pm 3,175$ units, $p=0.2$) did not differ between groups. We found that TDF offspring showed glomerular structural changes in approximately 12% of the total nephron number

($4,846 \pm 1,455$ altered glomerular units). Glomerular shrinkage was the most common abnormality encountered (fig. 3a-e). Thickening of the parietal layer of the Bowman's capsule and decreased glomerular capillarization were also seen in a few glomeruli.

Renal function data

TDF animals showed no statistically significant difference in inulin clearance at three and six months of age: third month, TDF 3.3 ± 0.2 vs. control 3.8 ± 0.2 mL/min, $p=0.1$; sixth month, TDF 3.2 ± 0.2 vs. control 3.0 ± 0.2 mL/min, $p=0.4$.

Biochemical parameters

Animals from the TDF group showed higher serum sodium at six months of age and lower urinary sodium excretion than the control group at three and six months of age. Plasma aldosterone was higher in the TDF group. Animals of the TDF group exhibited higher total cholesterol levels at six months of age. Proteinuria was not observed in animals of either group (TDF 11.1 ± 0.8 vs. control 11.8 ± 0.5 mg/24h, $p=0.6$). Table 1 shows the biochemical parameters evaluated at three and six months of age.

Western blot analysis

It is well known that apical NKCC2 and NCC are the major transporters for sodium reabsorption, respectively in the thick ascending limb of the loop of Henle and in the distal convoluted tubule. Rats from TDF group showed higher NKCC2 (148 ± 6 for TDF vs. $100 \pm 7\%$ for control, $p=0.0007$) and NCC (120 ± 5 for TDF vs. $99 \pm 7\%$ for control, $p=0.03$) protein abundance in the kidneys compared to the control group (fig. 4a-b). Other key renal sodium transporter is the ENaC. It consists of three different subunits (α , β , γ) involved in the regulation of sodium transport in the collecting duct. As shown in figure 5a-c, protein expression of ENaC in TDF-treated rats was significantly

higher than in the control rats (α -ENaC: TDF = 147 ± 2 vs. control = $102 \pm 2\%$, $p < 0.0001$; β -ENaC: TDF = 138 ± 11 vs. control = $99 \pm 8\%$, $p = 0.02$; and γ -ENaC: TDF = 151 ± 12 vs. control = $99 \pm 1\%$, $p = 0.007$). Interestingly, renal protein expression of angiotensinogen (TDF = 129 ± 9 vs. control = $101 \pm 1\%$, $p = 0.04$), AT1r (TDF = 173 ± 23 vs. control = $100 \pm 11\%$, $p = 0.03$), ACE (TDF = 214 ± 27 vs. control = $100 \pm 6\%$, $p = 0.01$) were also upregulated in the TDF group (fig. 6a-c), supporting the activation of RAAS.

Immunohistochemistry studies

Animals from TDF group exhibited increased expression of angiotensin II in the renal cortex at 6 months of age (TDF = 8.3 ± 1.6 vs. control = $1.0 \pm 0.2\%$, $p = 0.0009$). Intense cortical staining for angiotensin II was observed predominantly in the tubular cells. Figure 7 shows the quantification and immunolocalization of the cells stained for angiotensin II in the renal cortex.

Maternal evaluation

There were no differences among the groups in terms of food and water intake during pregnancy. There were only small and not statistically differences in blood pressure, RBF and RVR between groups, which were not accompanied by a significant change in GFR. No differences were observed in biochemical parameters between the mothers from control and TDF group. Serum aldosterone levels in the mothers of both TDF and control group were higher than in the offspring, which may represent the physiologic increase of RAAS activity during pregnancy.

Table 2 provides an overview of the biochemical and functional parameters in mothers from control and TDF group 48h after delivery.

DISCUSSION

Developmental programming is the term used to describe the concept that many adult conditions or diseases occur in response to environmental stimuli experienced during critical periods of fetal and early postnatal growth.²² Many studies support the finding that small modifications in fetal growth may have profound consequences in later life.²³⁻²⁶ The present study reports several important findings regarding the deleterious effects in the offspring exposed to TDF during gestation. Our data shows that TDF might be related to intrauterine growth retardation (IUGR) with consequences in adult life.

Compared with the study from Tarantal et al.,¹¹ in which high doses of TDF were administrated to pregnant rhesus monkeys, we found similar results regarding the lower anthropometrical parameters of the offspring exposed in-utero to TDF. On the other hand, we have further followed up the offspring from the TDF-exposed mothers until the adulthood and have reported systemic and renal adverse effects. Another important difference of our study concerns the TDF dose. We have used a 2-fold increase in the human dose of TDF. According to the Food and Drug Administration of the United States (FDA) a 6-fold increase in the human dose is necessary to obtain the rat-equivalent dose.²⁷ Thus, the TDF dose of our study was considered low dose.

In contrast, data from the PHACS cohort showed that TDF use during pregnancy was not associated with increased risk for lower birth weight or small for gestational age. However, lower mean length for age and head circumference-for-age (Z-score) were observed at age 1 year in the TDF-exposed infants.²⁸ A major shortcoming of this study was that the median duration of TDF exposure during pregnancy varied between the participants. Moreover, TDF deleterious effects might be related not only with the exposure duration but also with the period of the gestation in which TDF was administered. In this regard, there are a few advantages of using a rat model for our study. We were able to administrate TDF during the entire gestational

period. Furthermore, the rat is an excellent model for kidney disease and can reflect the pathologic process seen in human kidneys. It is also very appropriate for mechanistic studies of fetal programming.

It has been previously shown that TDF exhibits significant placental transport in rhesus monkeys, reaching peak fetal levels 1-3 hours after maternal administration.²⁹ TDF rapidly crosses the placenta in pregnant women on HAART, achieving a maternal-cord blood tenofovir ratio of approximately 0.65 – 1.00.³⁰ In rats, TDF transport across the placenta in both maternal and fetal directions has also been described.³¹ Thus, we assume that TDF passes over the placenta and disturbs the in utero environment and may induce a permanent response in the fetus and the newborn, leading to enhanced susceptibility to later diseases, such as hypertension and dyslipidemia. Moreover, we could not associate the restriction in fetal growth with any biochemical abnormalities, hemodynamic changes, increase in the oxidative stress, nor overactivation of RAAS, in the mothers treated with TDF during pregnancy, supporting the hypothesis of a direct effect of the drug on the fetus during organogenesis.

Other data supporting impaired fetal growth in TDF offspring are that animals from this group were born smaller than controls and changed their growth pattern after the third month of age, reaching the sixth month heavier than the control group. The increased growth rate has been previously described following IUGR, and is usually called catch-up growth. Many studies have associated the rapid increases in weight after birth with higher blood pressure and hypercholesterolemia, as shown in our experimental model.³²⁻³⁵ Nevertheless, birth weight should not be considered the triggering feature itself, but rather a simple measure of a more global process, leading to marked change of organ structure or function or both and to later life diseases.³⁶

Erhuma et al. have demonstrated that low protein diet during pregnancy was associated with programmed dyslipidemia of the offspring after nine months of age.³⁷ Zhang et al. have found similar results in rats subjected to dietary iron restriction during

gestation.³⁸ In retrospective and prospective clinical studies, lower birth weight and lower abdominal circumference at birth have been linked to dyslipidemia in the childhood, as well as in the adult life.^{39,40} In the liver, cholesterol is converted to biliary acids by the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMG-CoA reductase) and the cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1). Both enzymes undergo maturation in the fetal and neonatal life.⁴¹ Previous studies have revealed that the activity of these enzymes may be programmed in the context of IUGR.^{37,42} Consequently, we assume that TDF exposure during pregnancy might be a new pathway to programming dyslipidemia.

The RAAS plays a key role in regulating blood pressure and fluid balance, especially through the systemic effects of angiotensin II and aldosterone. However, the inappropriate activation of this system has been associated with systemic deleterious implications.⁴³ In this regard, there are several studies addressing the involvement of RAAS in the pathogenesis of hypertension. In the Framingham Offspring Study, the investigators found a 16% increase in the risk of an elevation in blood pressure and a 17% increase in the risk of hypertension per quartile increment in the serum aldosterone level.⁴⁴ Reynolds et al. showed higher aldosterone levels in men and women with low BW and high blood pressure.⁴⁵ In addition, Sahajpal et al. demonstrated that renal expression of AT1r was increased in the offspring of dams fed with low protein diet, and may have caused hypertension.⁴⁶ Accordingly, we found renal upregulation of several components of the RAAS, associated with higher levels of serum aldosterone, in the animals exposed to TDF during gestation. Therefore, we showed an important involvement of the renal and systemic RAAS in the pathogenesis of hypertension in our experimental model.

Brenner et al. have proposed that congenital or programmed reduction in nephron number and consequently in whole-kidney glomerular surface area may be a main factor in the generation of hypertension.^{47,48} However, the paucity of nephrons is not sufficient to explain hypertension in all models of prenatal programming. Other

elements would also participate together or independently of the number of glomeruli in the pathogenesis of hypertension.⁴⁹ The final number of nephrons in Wistar rats varies by strain, but around 40,000 glomeruli are considered normal.⁵⁰ We did not find a reduction in nephron numbers in either group studied. However, approximately 12% of the total nephron number in the TDF offspring did not display normal morphology. Glomerular shrinkage, the most common alteration encountered, has been described as the initial glomerular lesion of hypertensive nephrosclerosis.⁵¹ We performed histomorphometrical analysis at the third month of age, when the animals had already been hypertensive for approximately 60 days, which explains the glomerular structural changes in an initial stage.

Another important mechanism possibly involved in the pathogenesis of programmed hypertension is the upregulation of renal transporters of sodium. The thick ascending limb of the loop of Henle, together with the convoluted tubule and the collecting duct, reabsorb more than 30% of sodium filtered through glomeruli.⁵² Enhanced Na reabsorption in these segments of the nephron leads to many forms of hypertension.^{49,53,54} Thus, our study provides evidence that upregulation of renal sodium transporters may be involved in the generation and maintenance of hypertension in offspring exposed to TDF during gestation.

Moreover, we did not find proteinuria or a significant difference in inulin clearance at the third and the sixth month of age between the TDF and control groups, indicating that renal dysfunction was not associated with increased BP in this model.

In conclusion, the present study is the first demonstration using an experimental model that maternal exposure to TDF during pregnancy results in hypertension and dyslipidemia of offspring. Our findings also suggest that the upregulation of renal sodium transporters may contribute to the generation and maintenance of hypertension. Thus, the safety of TDF use during gestation remains uncertain and, given the increase in TDF use during pregnancy, the need for clinical studies on

exposed mothers and infants, particularly regarding the renal and cardiovascular outcomes, is compelling. Special attention must be paid to children and adolescents born to mothers who had already received TDF during pregnancy.

ACKNOWLEDGMENTS

We are sincerely grateful to Dr. Adriana Girardi for kindly providing us the anti-ACE antibody. We also thank Prof. Dr. Joel Claudio Heimann and Dr. Luzia Furukawa for allowing us to use their electro-sphygmomanometer.

Funding: This work was supported by Brazilian National Funding Agencies: “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo” – FAPESP (2012/50227-9) and “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico” – CNPq (309947/2009-0).

Conflicts of Interest: There are no conflicts of interest.

Preliminary results of this work were presented at the Cell/The Lancet Translational Medicine Conference (“What Will it Take to Achieve an AIDS-free World?”), San Francisco, CA, USA, 2013.

REFERENCES

1. UN Joint Programme on HIV/AIDS (UNAIDS), Global Report: UNAIDS Report on the Global AIDS Epidemic: 2013, November 2013, ISBN 978-92-9253-032-7. http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2013/gr2013/UNAIDS_Global_Report_2013_en.pdf.
2. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). HIV among Pregnant Women, Infants, and Children in the United States. http://www.cdc.gov/hiv/pdf/risk_WIC.pdf.
3. Fung HB, Stone EA, Piacenti FJ. Tenofovir disoproxil fumarate: a nucleotide reverse transcriptase inhibitor for the treatment of HIV infection. *Clin Ther* 2002; **24**: 1515-48.
4. Sorrell MF, Belongia EA, Costa J et al. National institutes of health consensus development conference statement: management of hepatitis B. *Ann Intern Med* 2009; **150**: 104-10.
5. Antiretroviral Pregnancy Registry Steering Committee. Antiretroviral Pregnancy Registry International Interim Report for 1 January 1989 through 31 January 2013. Wilmington, NC: Registry Coordinating Center; 2013. http://www.apregistry.com/forms/interim_report.pdf.
6. WHO. Antiretroviral drugs for treating pregnant women and preventing HIV infection in infants. Recommendations for a public health approach (2010 version). http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241599818_eng.pdf.
7. Neumanova Z, Cerveny L, Ceckova M et al. Interactions of tenofovir and tenofovir disoproxil fumarate with drug efflux transporters ABCB1, ABCG2, and ABCC2; role in transport across the placenta. *AIDS* 2014; **28**: 9-17.
8. Townsend CL, Cortina-Borja M, Peckham CS et al. Antiretroviral therapy and premature delivery in diagnosed HIV-infected women in the United Kingdom and Ireland. *AIDS* 2007; **21**: 1019-26.
9. Tuomala RE, Shapiro DE, Mofenson LM et al. Antiretroviral therapy during

- pregnancy and the risk of an adverse outcome. *N Engl J Med* 2002; **346**: 1863-70.
10. Martin F, Taylor GP. Increased rates of preterm delivery are associated with the initiation of highly active antiretroviral therapy during pregnancy: a single-center cohort study. *J Infect Dis* 2007; **196**:558-61.
 11. Tarantal AF, Castillo A, Ekert JE et al. Fetal and maternal outcome after administration of tenofovir to gravid rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002; **29**: 207-20.
 12. Van Rompay KK, Brignolo LL, Meyer DJ et al. Biological effects of short-term or prolonged administration of 9-[2-(phosphonomethoxy)propyl]adenine (tenofovir) to newborn and infant rhesus macaques. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 1469-87.
 13. Libório AB, Andrade L, Pereira LV et al. Rosiglitazone reverses tenofovir-induced nephrotoxicity. *Kidney Int* 2008; **74**:910-8.
 14. Karras A, Lafaurie M, Furco A et al. Tenofovir-related nephrotoxicity in human immunodeficiency virus-infected patients: three cases of renal failure, Fanconi syndrome, and nephrogenic diabetes insipidus. *Clin Infect Dis* 2003; **36**:1070-73.
 15. El Sahly HM, Teeter L, Zerai T et al. Serum creatinine changes in HIV-seropositive patients receiving tenofovir. *AIDS* 2006; **20**: 786-7.
 16. Izzedine H, Isnard-Bagnis C, Hulot JS et al. Renal safety of tenofovir in HIV treatment-experienced patients. *AIDS* 2004; **18**: 1074-6.
 17. Wang L, Kourtis AP, Ellington S et al. Safety of tenofovir during pregnancy for the mother and fetus: a systematic review. *Clin Infect Dis* 2013; **57**: 1773-81.
 18. Cruz-Orive LM, Weibel ER. Recent stereological methods for cell biology: a brief survey. *Am J Physiol* 1990; **258**: L148–56.
 19. Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988; **96**: 379–94.

20. Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF et al. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988; **96**: 857–81.
21. Gundersen HJ, Jensen EB. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc* 1987; **147**: 229–63.
22. Dötsch J, Plank C, Amann K. Fetal programming of renal function. *Pediatr Nephrol* 2012; **27**: 513-20.
23. Baum M. Role of the kidney in the prenatal and early postnatal programming of hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010; **298**: F235-47.
24. Luyckx VA, Bertram JF, Brenner BM et al. Effect of fetal and child health on kidney development and long-term risk of hypertension and kidney disease. *Lancet* 2013; **382**: 273-83.
25. Vikse BE, Irgens LM, Leivestad T et al. Low birth weight increases risk for end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2008; **19**: 151-7.
26. Khalil CA, Traver F, Fetita S et al. Fetal exposure to maternal type 1 diabetes is associated with renal dysfunction at adult age. *Diabetes* 2010; **59**: 2631-6.
27. Sharma V, McNeill JH. To scale or not to scale: the principles of dose extrapolation. *Br J Pharmacol* 2009; **157**: 907-21.
28. Siberry GK, Williams PL, Mendez H et al. Safety of tenofovir use during pregnancy: early growth outcomes in HIV-exposed uninfected infants. *AIDS* 2012; **26**: 1151-9.
29. Tarantal AF, Marthas ML, Shaw JP et al. Administration of 9-[2-(R)-(phosphonomethoxy)propyl]adenine (PMPA) to gravid and infant rhesus macaques (*Macaca mulatta*): safety and efficacy studies. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1999; **20**: 323-33.
30. Foster C, Lyall H, Olmscheid B et al. Tenofovir disoproxil fumarate in pregnancy and prevention of mother-to-child transmission of HIV-1: is it time to move on from

- zidovudine? *HIV Med* 2009; **10**: 397-406.
31. Neumanova Z, Cervený L, Cecková M et al. Interactions of tenofovir and tenofovir disoproxil fumarate with drug efflux transporters ABCB1, ABCG2, and ABCC2; role in transport across the placenta. *AIDS* 2014; **28**: 9-17.
 32. Ben-Shlomo Y, McCarthy A, Hughes R et al. Immediate postnatal growth is associated with blood pressure in young adulthood: the Barry Caerphilly Growth Study. *Hypertension* 2008; **52**: 638-44.
 33. Hemachandra AH, Howards PP, Furth SL et al. Birth weight, postnatal growth, and risk for high blood pressure at 7 years of age: results from the Collaborative Perinatal Project. *Pediatrics* 2007; **119**: e1264-70.
 34. Lopes KL, Furukawa LN, de Oliveira IB et al. Perinatal salt restriction: a new pathway to programming adiposity indices in adult female Wistar rats. *Life Sci* 2008; **82**: 728-32.
 35. Vidonho AF Jr, da Silva AA, Catanozi S et al. Perinatal salt restriction: a new pathway to programming insulin resistance and dyslipidemia in adult wistar rats. *Pediatr Res* 2004; **56**: 842-8.
 36. Nuyt AM, Alexander BT. Developmental programming and hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2009; **18**: 144-52.
 37. Erhuma A, Salter AM, Sculley DV et al. Prenatal exposure to a low-protein diet programs disordered regulation of lipid metabolism in the aging rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; **292**: E1702-14.
 38. Zhang J, Lewis RM, Wang C et al. Maternal dietary iron restriction modulates hepatic lipid metabolism in the fetuses. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; **288**: R104-11.
 39. Boney CM, Verma A, Tucker R et al. Metabolic syndrome in childhood: association with birth weight, maternal obesity, and gestational diabetes mellitus. *Pediatrics* 2005; **115**: e290-6.

40. Barker DJ, Martyn CN, Osmond C et al. Growth in utero and serum cholesterol concentrations in adult life. *BMJ* 1993; **307**: 1524-7.
41. Innis SM. Influence of maternal cholestyramine treatment on cholesterol and bile acid metabolism in adult offspring. *J Nutr* 1983; **113**: 2464-70.
42. Liu X, Qi Y, Tian B et al. Maternal protein restriction induces alterations in hepatic tumor necrosis factor- α /CYP7A1 signaling and disorders regulation of cholesterol metabolism in the adult rat offspring. *J Clin Biochem Nutr* 2014; **55**:40-7.
43. Grigore D, Ojeda NB, Robertson EB et al. Placental insufficiency results in temporal alterations in the renin angiotensin system in male hypertensive growth restricted offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; **293**: R804-11.
44. Vasan RS, Evans JC, Larson MG et al. Serum aldosterone and the incidence of hypertension in nonhypertensive persons. *N Engl J Med* 2004; **351**: 33-41.
45. Reynolds RM, Walker BR, Phillips DI et al. Programming of hypertension: associations of plasma aldosterone in adult men and women with birth weight, cortisol, and blood pressure. *Hypertension* 2009; **53**: 932-6.
46. Sahajpal V, Ashton N. Increased glomerular angiotensin II binding in rats exposed to a maternal low protein diet in utero. *J Physiol* 2005; **563**: 193-201.
47. Brenner BM, Garcia DL, Anderson S. Glomeruli and blood pressure: Less of one, more the other? *Am J Hypertens* 1988; **1**: 335-47.
48. Brenner BM, Chertow GM. Congenital oligonephropathy and the etiology of adult hypertension and progressive renal injury. *Am J Kidney Dis* 1994; **23**: 171-5.
49. Manning J, Beutler K, Knepper MA et al. Upregulation of renal BSC1 and TSC in prenatally programmed hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; **283**: F202-6.
50. Tucker MJ. *Diseases of the wistar rat*. London: Taylor & Francis Limited, 1997.
51. Anderson S. Pathogenesis of nephrosclerosis and chronic kidney disease. In: Izzo JL, Sica DA, Black HR, eds. *Hypertension Primer*. Philadelphia: Lippincott Williams

- & Wilkins, 2008; 222-8.
52. Schiessl IM, Rosenauer A, Kattler V et al. Dietary salt intake modulates differential splicing of the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2. *Am J Physiol Renal Physiol* 2013; **305**: F1139-48.
 53. Gonzalez-Vicente A, Garvin JL. Angiotensin II-induced hypertension increases plasma membrane Na pump activity by enhancing Na entry in rat thick ascending limbs. *Am J Physiol Renal Physiol* 2013; **305**: F1306-14
 54. Cheng CJ, Lozano G, Baum M. Prenatal programming of rat cortical collecting tubule sodium transport. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012; **302**: F674-8.

Table 1 – Biochemical measurements in animals from the tenofovir (TDF) and control group at three and six months of age.

Evaluated Data	3 rd Month			6 th Month		
	Control	TDF	[#] p	Control	TDF	[#] p
<u>Plasma</u>						
Na⁺ (mEq/L)	139±2	140±1	0.6	142±3	152±3	0.001
K⁺ (mEq/L)	5.0±0.2	5.0±0.2	0.8	4.4±0.2	4.5±0.2	0.7
Cholesterol*(mg/dL)	52±3	54±5	0.7	52±4	72±3	0.002
Aldo (pg/mL)	112±23	256± 45	0.01	116±26	247± 28	0.002
<u>Urine</u>						
U_{Na}V (mg/24h)	0.86±0.07	0.61±0.07	0.02	0.55±0.07	0.33±0.02	0.02
U_KV (mg/24h)	2.56±0.11	2.30±0.11	0.1	1.67±0.18	1.30±0.05	0.1

Data are reported as mean ± SEM; Unpaired t-test was employed to compare the means of data from tenofovir (TDF) and control group; [#]p: TDF vs. control at three and six months of age, respectively; *total cholesterol; Aldo: serum aldosterone; U_{Na}V: urinary sodium excretion; U_KV: urinary potassium excretion.

Table 2: Biochemical and functional parameters in mothers from the tenofovir (TDF) and control group 48h after delivery

	Control	TDF	#p
<u>Plasma</u>			
Na⁺ (mEq/L)	143±2	141±3	0.5
K⁺ (mEq/L)	4.6±0.6	3.8±0.2	0.1
Ca⁺⁺ (mg/dL)	3.7±0.5	3.1±0.5	0.2
P⁺⁺ (mEq/L)	5.1±0.6	5.5±0.5	0.6
Aldo (pg/mL)	219±31	324± 68	0.1
<u>Urine</u>			
GFR (ml/min)	2.93±0.13	2.78±0.17	0.4
TBARS (nmol/24h)	151±20	158±20	0.8
<u>Hemodynamic studies</u>			
MAP (mmHg)	128±4	136±5	0.2
RBF (ml/min)	6.0±0.4	5.5±0.1	0.2
RVR (mmHg/ml/min)	21±1	24±1	0.1

Data are reported as mean ± SEM; Unpaired t-test was employed to compare the means of data; #p: tenofovir (TDF) vs. control mothers; Aldo: serum aldosterone; GFR: glomerular filtration rate accessed by inulin clearance; TBARS: thiobarbituric acid reactive substances; MAP: mean arterial pressure; RBF: renal blood flow; RVR: renal vascular resistance.

FIGURES

Figure 1: (a) Experimental protocol. (b) Birth weight in tenofovir (TDF) group is reduced compared to control. (c) Catch-up growth from TDF group, reaching the sixth month heavier than the control group (C). Data are expressed as mean $\pm$ SEM; Unpaired t-test was used to evaluate statistical significance; * $p < 0.01$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$; TDF versus C.

Figure 2: Systolic blood pressure increased progressively after 30 days of age in the tenofovir (TDF) group compared to controls (C). Unpaired t-test was applied to evaluate statistical significance; *** $p < 0.0001$; TDF versus C.

Figure 3: Histopathology of renal cortex. Low (a) and high (b) magnification photomicrographs of control kidneys showing normal renal corpuscles and normal-

sized glomeruli. Tenofovir (TDF) rat kidneys showing (c, *) glomerular shrinkage (atrophy), (d, arrow) enlargement of the capsular space and (e, arrow) reduced vascularization of the glomerulus.

Figure 4: Immunoblotting of kidney fractions from tenofovir (TDF) and control (C) animals at six months of age. TDF rats exhibited enhanced renal expression of Na-K-2Cl cotransporter (NKCC2) – 160 kDa (a) and Na-Cl (NCC) cotransporter – 160 kDa (b). Data are expressed in %. Data are presented as mean $\pm$ SEM; * p <0.01 (Unpaired t-test); TDF versus C.

Figure 5: Immunoblotting of kidney fractions from tenofovir (TDF) and control (C) animals at six months of age. TDF rats exhibited enhanced renal expression of epithelial sodium channel (ENaC) α (97 kDa), β (95 kDa) and γ (85 kDa) subunits, respectively (a), (b) and (c). Data are expressed in %. Data are presented as mean $\pm$ SEM; * $p < 0.01$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$ (Unpaired t-test); TDF versus C.

Figure 6: Immunoblotting of kidney fractions from tenofovir (TDF) and control (C) animals at six months of age. TDF animals showed higher renal protein abundance of angiotensinogen (Ang) – 60 kDa (a), angiotensin II receptor type 1 (AT1r) – 43 kDa (b) and angiotensin-converting enzyme (ACE) – 95 kDa (c). Data are expressed in %. Data are mean $\pm$ SEM; * $p < 0.01$; ** $p < 0.001$ (Unpaired t-test); TDF versus C.

Figure 7: Expression of Angiotensin II in renal tissue. Immunostaining for angiotensin II (brown) in kidney cortex samples from control (C) and tenofovir (TDF) offspring, respectively (a) and (b). Magnification: x400. The graph (c) represents the renal cortex staining quantification for angiotensin II in C (n=6) and TDF (n=5) offspring. Data are mean $\pm$ SEM; ***p=0.0009 (Unpaired t-test); TDF versus C.