



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E BIOFÍSICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM FISILOGIA E FARMACOLOGIA

OLGA LUCIA MAQUILON MORENO

Avaliação dos efeitos cardiometabólicos do inibidor de integrase
Dolutegravir

Belo Horizonte
2020

OLGA LUCIA MAQUILON MORENO

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CARDIOMETABÓLICOS DO
INIBIDOR DE INTEGRASE DOLUTEGRAVIR.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Fisiologia e Farmacologia.

Área de concentração: Fisiologia

Orientador: Dr. Luciano Dos Santos Aggum Capettini

Coorientador: Dr. Edenil Costa Aguilar

BELO HORIZONTE
2020

043 Moreno, Olga Lucia Maquilon.
Avaliação dos efeitos cardiometabólicos do inibidor de integrase dolutegravir
[manuscrito] / Olga Lucia Maquilon Moreno. – 2020.
69 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Dr. Luciano dos Santos Aggum Capettini. Coorientador: Dr. Edenil Costa
Aguilar.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Fisiologia. 2. Doenças Cardiovasculares. 3. Fígado Gorduroso. 4. Estresse
Oxidativo. 5. Inibidores de Integrase de HIV. I. Capettini, Luciano dos Santos
Aggum. II. Aguilar, Edenil Costa. III. Universidade Federal de Minas Gerais.
Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612

"AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CARDIOMETABÓLICOS DO INIBIDOR DE INTEGRASE DOLUTEGRAVIR"

OLGA LUCIA MAQUILON MORENO

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **24 de março de 2020**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



PROFA. DRA. DANIELLA BONAVENTURA
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



PROF. DR. STÉFANY BRUNO DE ASSIS CAU
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



DR. EDENIL COSTA AGUILAR
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COORDENADOR



PROF. DR. LUCIANO DOS SANTOS AGGUM CAPETTINI
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ORIENTADOR

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 24 de março de 2020

AGRADECIMENTOS

Ao professor Luciano Capettini pela orientação no desenvolvimento deste projeto, por todo apoio, confiança e amizade.

Aos meus colegas e amigos do laboratório LBV pelo acolhimento, disponibilidade, colaboração e por fazer meus dias mais felizes.

Aos professores e colegas colaboradores do meu projeto, técnicos de laboratório e biotério, muito obrigada pelo apoio, colaboração e valiosas sugestões durante o desenvolvimento deste projeto.

Aos professores do programa de pós-graduação em fisiologia e farmacologia, pelos ensinamentos.

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade para participar e por contribuir no trabalho.

Ao Brasil e à UFMG pela oportunidade de realização do mestrado.

A agência de fomento CAPES.

A minha mãe, meu maior exemplo de fé e perseverança, as minhas irmãs e meu esposo por ser minha força.

À Deus por tornar todos meus sonhos possíveis.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	8
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	12
RESUMO	13
ABSTRACT	14
1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Terapia antirretroviral	16
1.2. Terapia antirretroviral e doença cardiovascular	18
1.3. Antirretrovirais, disfunção endotelial e estresse oxidativo	21
1.4. Terapia antirretroviral e doença hepática gordurosa não alcoólica	26
2. JUSTIFICATIVA	29
3. OBJETIVOS	30
3.1. Objetivos Gerais	30
3.2. Objetivos Específicos	30
4. MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1. Modelo animal e tratamento	31
4.2. Coleta de tecidos	31
4.3. Determinação dos níveis séricos de colesterol, triglicérides, glicose, TGO e TGP	32
4.4. Análises morfométricos	32

4.5.	Determinação de colesterol e triglicérides hepáticos	33
4.6.	Avaliação do estresse oxidativo no fígado	34
4.6.1.	<i>Avaliação da atividade da Catalase</i>	34
4.6.2.	<i>Avaliação da atividade da SOD</i>	34
4.6.3.	<i>Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS):</i>	35
4.7.	Avaliação Eletrocardiográfica	35
4.8.	Reatividade vascular sistema de banho de órgãos isolados	36
4.9.	Microscopia de fluorescência	37
4.10.	Imunohistoquímica para nitrotirosina	38
4.11.	Avaliação da pressão arterial	38
4.12.	Análise estatística	38
5.	RESULTADOS	40
5.1.	GLICEMIA E PERFIL LIPIDICO SÉRICO.	40
5.2.	PARÂMETROS HEPÁTICOS	41
5.2.1.	<i>Transaminases hepáticas</i>	41
5.2.2.	<i>Histopatologia hepática</i>	41
5.2.3.	<i>Score de esteatose</i>	42
5.2.4.	<i>Score de inflamação</i>	42
5.2.5.	<i>Concentração de lipídios hepáticos</i>	43
5.3.	AVALIAÇÃO DO STATUS OXIDATIVO HEPÁTICO	44
5.4.	REATIVIDADE VASCULAR SISTEMA DE BANHO DE ÓRGÃOS ISOLADOS	45
5.4.1.	<i>Efeito do DTG no relaxamento vascular induzido pela acetilcolina</i>	45
5.4.2.	<i>Efeito do superóxido no relaxamento vascular induzido pela acetilcolina</i>	46
5.4.3.	<i>Efeitos do tratamento com DTG na contratilidade vascular</i>	47
5.5.	Produção de NO, superóxido e peróxido de hidrogênio.	49
5.7.	Medida da produção de nitrotirosina por imunohistoquímica	51
5.8.	Pressão arterial sistólica	51
5.9.	Avaliação eletrocardiográfica	52

5.10. Histopatología cardíaca	53
6. DISCUSSÃO	54
7. CONCLUSÃO	59
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
ANEXO - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
µg/mL	Micrograma por mililitro
µM	Micromolar
ACh	Acetilcolina
AGL	Ácidos graxos livres
ARV	Antirretrovirais
AZT	Zidovudina
BH4	Tetrahidrobiopterina
°C	Grau centígrado
CAPI	Centro de Aquisição e processamento de imagens
CaMKII	Calmodulina cinase
DAPI	4,6-diamidina-2-fenilindole, dihidrochloride
DAF-FM	4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluoresceina
DCF	2',7'-dichlorofluoresceina
DCFH	2,7-dichlorodihydrofluorescein
DCV	Doença cardiovascular
DHE	Dihydroethidium dihidroetidina
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTG	Dolutegravir
eNOS	Oxido nítrico sintase endotelial
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ELISA	“Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”
FENIL	Fenilefrina
cGMP	Monofosfato cilico de guanosina
HDL	High density lipoprotein - lipoproteína de alta densidade
HE	Hematoxilina-eosina

HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HSL	Lipase hormônio-sensível
HUVEC	Células endoteliais umbilicais humanas
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A
h	Hora(s)
ICAM	Molécula-1 de adesão intercelular
ITRNs	Inibidores nucleosídeos da transcriptase reversa
ITRNNs	Inibidores não nucleosídeos da transcriptase reversa
IPs	Inibidores de protease
INIs	Inibidores de integrase
HAART	Terapia antirretroviral altamente ativa
HDL	Lipoproteína de alta densidade
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDLox	LDL oxidada
LPC	Lisofosfatidilcolina
LPL	Lipoproteína lipase
mg	Miligrama
mg/dL	Miligrama por decilitro
mg/kg	Miligramas por quilograma de peso
MDA	Malondialdeído
MCP1	Moléculas quimiotáticas para monócitos
MnSOD	Superóxido dismutase mitocondrial
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NF-κB	Fator de transcrição nuclear-κappa B
nm	Nanômetro
NOS	Óxido nítrico sintase
NO	Óxido nítrico
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NaOH	Hidróxido de sódio
O ⁻²	Ânion superóxido
OH ⁻	Radical hidroxila

ONOO ⁻	Peroxinitrito
PBS	Salina tamponada com fosfato
PCAM	Molécula de adesão celular
PKA	Proteína cinase A
PVHIV	Pessoas com vírus da imunodeficiência humana
QM	Quilomícrons
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
SOD	Superóxido dismutase
SDS	Sodium dodecil (lauril) sulfato
TARV	Terapia antirretroviral
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TG	Triglicerídeos
TGO	Transaminase glutâmico oxalacética
TGP	Transaminase glutâmico pirúvica
TRLs	Lipoproteínas ricas em triglicerídeos
U/mL	Unidades por mililitro
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VCAM-1	Molécula-1 de adesão vascular
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática dos efeitos da infecção pelo HIV-1 e seu tratamento em células endoteliais vasculares.....	22
Figura 2. Glicemia de jejum.....	40
Figura 3. Perfil lipídico sérico.....	40
Figura 4. Transaminases hepáticas.	41
Figura 5. Cortes histológicos de fígado corados com hematoxilina e eosina.....	42
Figura 6. Score de esteatose em cortes de fígados corados com H&E.	42
Figura 7. Score de inflamação em cortes de fígados corados com H&E.	43
Figura 8. Concentração de lipídios hepáticos.....	43
Figura 10. Efeito do DTG no relaxamento vascular induzido pela acetilcolina.	46
Figura 11. Efeito do superóxido no relaxamento vascular induzido pela acetilcolina.	47
Figura 12. Curvas de resposta vasoconstritora induzida por fenilefrina.	48
Figura 13. Medidas da produção de NO, superóxido, H ₂ O ₂ por fluorescência em cortes de aorta torácica de animais tratados com DTG e controles.....	49
Figura 14. Determinação da expressão de eNOS e nNOS por imunofluorescência em cortes de aorta torácica de animais tratados com DTG e controles.....	50
Figura 15. Determinação da produção de nitrotirosina por imunohistoquímica em cortes de aorta torácica de animais tratados com DTG e controles.....	51
Figura 16. Pressão arterial sistólica de camundongos tratados com DTG e controles.....	52
Figura 17. Traçados representativos do eletrocardiograma. (A) Eletrocardiograma com morfologia normal, (B). Frequência cardíaca. (C) Intervalo PR. (D) Duração do complexo QRS. (E) intervalo QTc..	52
Figura 18. Cortes histológicos de coração corados com hematoxilina e eosina..	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Score de esteatose.....	32
Tabela 2. Score de inflamação.	33
Tabela 3. Valores de Emáx dos resultados dos experimentos de relaxamento vascular.....	47
Tabela 4. Valores de Emáx dos resultados dos experimentos de contração vascular.	48

RESUMO

Evidências crescentes demonstram o aumento das taxas de doenças cardiovasculares entre pessoas vivendo com HIV/AIDS. Tanto a infecção pelo HIV-1 quanto a terapia antirretroviral estão implicadas no desenvolvimento de dislipidemias, aumento do estresse oxidativo e disfunção endotelial, sendo esses importantes eventos fisiopatológicos para o desenvolvimento da aterosclerose. O dolutegravir (DTG) é um inibidor da enzima integrase do HIV-1 que tem sido utilizado como a primeira opção de terapia antirretroviral desde 2017. No entanto, não há dados consistentes na literatura demonstrando as ações cardiovasculares e metabólicas dos inibidores da integrase, particularmente do DTG. O objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto do tratamento subcrônico com o DTG no sistema cardiovascular, perfil lipídico, função hepática e estresse oxidativo em Camundongos C57BL/6J. Camundongos machos foram tratados com DTG (10mg/kg) ou veículo durante 28 dias, via gavagem. Curvas concentração-resposta com acetilcolina e fenilefrina foram realizadas em anéis de aorta, utilizando sistema de banho de órgãos. O tratamento com DTG gerou redução na resposta relaxante induzida pela acetilcolina. Este efeito foi associado a uma menor produção de NO nas aortas, corroborada pela redução na expressão de eNOS e nNOS também observada neste sítio. Embora não tenha sido encontrada diferença na produção de superóxido e peróxido de hidrogênio, houve aumento na formação de nitrotirosina, sugerindo maior produção de peroxinitrito nas aortas do grupo DTG. Não foram observadas alterações na glicemia e perfil lipídico sérico. No entanto, houve aumento da transaminase TGP sérica e peroxidação lipídica hepática, além de diminuição da atividade da SOD no fígado. Tais efeitos foram associados ao desenvolvimento de esteatose hepática no grupo DTG. A histopatologia cardíaca, avaliação da pressão arterial e eletrocardiográfica não demonstraram diferença entre os grupos. Os resultados deste trabalho permitem concluir que o tratamento subcrônico com DTG induziu disfunção endotelial, mediada pela diminuição da biodisponibilidade de NO, em decorrência da menor expressão das NOS. Embora não tenha sido observado alterações nos parâmetros cardíacos avaliados, o DTG induziu esteatose e maior estresse oxidativo hepático.

Palavras chave: Disfunção endotelial, doenças cardiovasculares, Dolutegravir, esteatose hepática, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Increasing evidence demonstrates the increased rates of cardiovascular disease among people living with HIV / AIDS. Both HIV-1 infection and antiretroviral therapy are implicated in the development of dyslipidemia, increased oxidative stress and endothelial dysfunction, these being important pathophysiological events for the development of atherosclerosis. Dolutegravir (DTG) is an inhibitor of the HIV-1 integrase enzyme that has been used as the first antiretroviral therapy option since 2017. However, there is no consistent data in the literature demonstrating the cardiovascular and metabolic actions of integrase inhibitors, particularly of the DTG. The objective of this work was to evaluate the impact of subchronic treatment with DTG on the cardiovascular system, lipid profile, liver function and oxidative stress in C57Bl / 6J mice. Male mice were treated with DTG (10mg / kg) or vehicle for 28 days, via gavage. Concentration-response curves with acetylcholine and phenylephrine were performed on aortic rings, using an organ bath system. Treatment with DTG generated a reduction in the relaxing response induced by acetylcholine. This effect was associated with a lower production of NO in the aortas, corroborated by the reduction in the expression of eNOS and nNOS also observed in this site. Although no difference was found in the production of superoxide and hydrogen peroxide, there was an increase in the formation of nitrotyrosine, suggesting greater production of peroxynitrite in the aortas of the DTG group. There were no changes in blood glucose and serum lipid profile. However, there was an increase in serum TGP transaminase and hepatic lipid peroxidation, in addition to a decrease in SOD activity in the liver. Such effects were associated with the development of fatty liver in the DTG group. Cardiac histopathology, blood pressure and electrocardiographic assessment showed no difference between groups. The results of this work allow us to conclude that the subchronic treatment with DTG induced endothelial dysfunction, mediated by the decrease in the bioavailability of NO, due to the lower expression of NOS. Although no changes were observed in the cardiac parameters evaluated, the DTG induced steatosis and increased hepatic oxidative stress.

Keywords: Endothelial dysfunction, cardiovascular diseases, Dolutegravir, hepatic steatosis, oxidative stress.

1. INTRODUÇÃO

A terapia antirretroviral gerou uma diminuição significativa na morbidade e mortalidade da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana além de uma importante extensão da expectativa de vida das pessoas vivendo com HIV (May et al., 2014). Os medicamentos antirretrovirais (ARV) evoluíram com o conhecimento sobre a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e a qualidade da terapia antirretroviral é cada vez melhor.

A necessidade de novos agentes antirretrovirais focados principalmente em novos alvos terapêuticos ainda é substancial mesmo após mais de 30 anos na era da terapia antirretroviral. Os medicamentos ARV atuais têm um melhor perfil de tolerabilidade, barreiras mais altas à resistência e menos interações medicamentosas. No entanto, os benefícios das combinações antirretrovirais são atenuados por um amplo espectro de efeitos colaterais, incluindo uma ampla gama de distúrbios laboratoriais e clínicos (Calza et al., 2016). Neste contexto, o acréscimo de novas classes de drogas é importante para limitar o surgimento de cepas resistentes.

Atualmente temos medicamentos direcionados para etapas críticas no ciclo de vida do HIV-1 e a mais nova classe de medicamentos aprovados no tratamento do HIV são os inibidores da integrase (INIs) (Yadav, Kumar, Kumar, & Singh, 2018).

Dada a introdução relativamente recente dos inibidores da integrase pelos sistemas de saúde, o efeito dessa classe de medicamentos sobre o metabolismo é uma área de pesquisa ainda pouco desenvolvida.

Evidências crescentes demonstram um aumento das taxas de doenças cardiovasculares entre pessoas vivendo com HIV/AIDS (Boccarda et al., 2013; Feinstein et al., 2019). Tanto a infecção pelo HIV-1 quanto a terapia antirretroviral tem sido associados no desenvolvimento de dislipidemias (Anuurad et al., 2008; Calza et al., 2016), aumento do estresse oxidativo, disfunção endotelial, hepática e do tecido adiposo, sendo eles importantes eventos fisiopatológicos no desenvolvimento da aterosclerose (Crum-Cianflone et al., 2011; Marincowitz et al., 2019; Moure et al., 2016; Triant, Lee, Hadigan, & Grinspoon, 2007).

O Dolutegravir (DTG) é um inibidor da integrase do HIV-1, biodisponível por via oral, com atividade contra o vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) (Rathbun, Lockhart, Miller, & Liedtke, 2014). Desde 2017 o DTG é recomendado no início da terapia antirretroviral, principalmente pelo fato de que ainda não foi documentado o

desenvolvimento de mutações de resistência em indivíduos que iniciam a terapia. Contudo, não há dados consistentes sobre as ações cardiometabólicas do DTG. Particularmente, não se conhecem os efeitos a longo prazo do uso do DTG sobre parâmetros cardiovasculares, como função vascular, cardíaca e pressão arterial, nem sobre o perfil lipídico.

1.1. Terapia antirretroviral

De acordo com UNAIDS atualmente tem 37,9 milhões de pessoas em todo o mundo vivendo com HIV e o número continua a aumentar, com um número estimado de 24,5 milhões [21,5–25,5 milhões] de pessoas recebendo terapia antirretroviral em meados de 2019 - mais do que o dobro do número de tratamentos em 2012 (Carlsson, 2019). Segundo dados do boletim epidemiológico de HIV/AIDS 2019 do ministério da saúde do Brasil estima-se que 866 mil pessoas vivem com o HIV no Brasil, 593.000 brasileiros recebem tratamento antirretroviral e a doença atinge todos os grupos sociais e faixas etárias.

A primeira classe de medicamentos que demonstrou ter atividade contra o HIV foram os inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (ITRN), e em 1987 teve início o uso da monoterapia com Zidovudina (AZT) (Vella, Schwartländer, Sow, Eholie, & Murphy, 2012).

Atualmente estão disponíveis 6 famílias ou classes de antirretrovirais que são agrupados de acordo com seu mecanismo de ação: 1) inibidores nucleosídeos da transcriptase reversa (ITRN) (abacavir, didanosina, emtricitabina, lamivudina, zidovudina e tenofovir), 2) inibidores não nucleosídeos da transcriptase reversa (ITRNN) (efavirenz, nevirapina, etravirina, rilpivirina, delavirdine e doravirine), 3) inibidores de protease (IP) (saquinavir, ritonavir, atazanavir, fosamprenavir, lopinavir e indinavir), 4) inibidores de fusão ou de entrada (enfuvirtida ou T-20 e Ibalizumab-uiyk), 5) Antagonista dos correceptores CCR5 (Maraviroc) e 6) inibidores de integrase (INI) (raltegravir, elvitegravir, dolutegravir, cabotegravir e bictegravir) (Bernal, 2016; Pau & George, 2014).

A terapia antirretroviral altamente ativa tem sido usada de maneira eficaz e segura no manejo do HIV / AIDS desde 1996 (Esté & Cihlar, 2010) é definida como qualquer combinação de 3 drogas antirretrovirais, geralmente 2 inibidores da transcriptase reversa

de nucleosídeo (ITRN) e um inibidor de integrase (INI) ou um inibidor de protease (IP), ou um inibidor de transcriptase reversa não-nucleosídeo (ITRNN) (Wainberg, 2012).

Segundo o protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos do ministério da saúde do Brasil de 2017, para os casos em início de tratamento, o esquema inicial preferencial deve ser a associação de dois ITRN – lamivudina e tenofovir – associados ao inibidor de integrase – dolutegravir (DTG).

Os INIs se ligam à integrase e, especificamente, têm como alvo o processo de integração do DNA do HIV-1 transcrito reversamente no DNA cromossômico do hospedeiro, catalisado pela enzima integrase codificada pelo vírus (Yadav et al., 2018). Estes fármacos demonstraram sua eficácia contra o HIV in vitro e em pacientes, e são particularmente úteis contra cepas de vírus que são resistentes a outras classes de fármacos.

Os primeiros inibidores da integrase foram testados há mais de 30 anos, mas sua utilização clínica apresentou diversas barreiras (Pommier, Johnson, & Marchand, 2005). O protótipo dos INIs, o raltegravir foi aprovado para tratamento em 2007 (Nguyen et al., 2011; Yadav et al., 2018). Desde então, vários outros INIs foram introduzidos incluindo o elvitegravir, o dolutegravir e, mais recentemente, o bictegravir que demonstraram grande utilidade como parte dos regimes antirretrovirais tanto em pacientes sem experiência prévia quanto em tratamento (Brehm et al., 2019).

O Dolutegravir é um inibidor de integrase de segunda geração e após administração oral, se liga ao local ativo da integrase, evitando que a enzima se ligue ao ácido desoxirribonucleico retroviral (DNA) e bloqueia a etapa de transferência da fita, essencial para o ciclo de replicação do HIV. Evitando desse modo a replicação do HIV-1. O dolutegravir é bem tolerado, apresenta baixo potencial para interações medicamentosas e possui uma meia-vida sérica longa, tem atividade antiviral eficaz com uma dose diária e menor risco de descontinuação de uso devido a eventos adversos (Rathbun et al., 2014; van Lunzen et al., 2012). O DTG também tem uma elevada barreira genética ao desenvolvimento de resistência ao medicamento, o que é importante devido à tendência crescente de resistência aos tratamentos.

O início da terapia antirretroviral com esquema contendo DTG está recomendado para o tratamento preferencial inicial e resgate terapêutico nos casos de falha à terapia ARV, assim como na terapia pós-exposição. Mais recentemente, foi incluída, nos protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas do HIV no Brasil, a recomendação de

mudança para o DTG nos esquemas de tratamento em que o paciente apresente eventos adversos e toxicidades indesejáveis. Segundo dados do Ministério de saúde 87% das pessoas que iniciaram tratamento antirretroviral em 2018, começaram com esquema antirretroviral contendo Dolutegravir.

1.2. Terapia antirretroviral e doença cardiovascular

O aumento significativo da expectativa de vida de pessoas infectadas pelo HIV tem sido acompanhado por uma incidência crescente de várias anormalidades metabólicas, incluindo dislipidemia, redistribuição ou lipodistrofia do tecido adiposo, resistência à insulina e hiperglicemia (Feinstein et al., 2019) e aumento das taxas de doença cardiovascular.

As complicações vasculares no curso da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) são multifatoriais e podem ser causadas pelo próprio vírus, pelas infecções e neoplasias oportunistas relacionadas e surgem ou podem ser agravadas com a terapia antirretroviral altamente ativa.

À medida que a população com HIV está envelhecendo, as doenças cardiovasculares podem se tornar um problema de saúde cada vez maior no futuro. Portanto, o diagnóstico e o tratamento precoces dos fatores de risco cardiovascular são justificados nessa população.

As populações envelhecidas de pacientes com infecção pelo HIV-1 experimentam comorbidades relacionadas à idade, como diabetes e doenças cardiovasculares, renais e ósseas, que se manifestam mais cedo do que em pacientes não infectados pelo HIV (Cihlar & Fordyce, 2016; Guaraldi et al., 2011).

Sendo a doença cardíaca coronariana e a doença cerebrovascular as principais causas de morte na população em geral, estas também ocorrem mais cedo e com maior frequência entre os indivíduos infectados pelo HIV que recebem terapia antirretroviral, conforme demonstrado por vários estudos de coorte (Law et al., 2003; Triant et al., 2007). O risco relativo de várias manifestações de doença cardiovascular é geralmente 1,5 a 2 vezes maior para pacientes vivendo com HIV comparados com indivíduos não infectados (Guaraldi et al., 2011; Shah et al., 2018).

Os efeitos cumulativos do tratamento antirretroviral ao longo de décadas ainda são controversos e não totalmente compreendidos e embora agora esteja claramente

estabelecido que o tratamento antirretroviral está vinculado a distúrbios metabólicos, o impacto a longo prazo dessas condições permanece objeto de discussão.

Vários estudos clínicos demonstram que a terapia antirretroviral convencional altera de maneira significativa o perfil lipídico do indivíduo com o aumento nos níveis de triglicérides, fração LDL do colesterol, redução da fração HDL, associados ou não à síndrome metabólica (Abebe et al., 2014; Dave et al., 2016; Nduka, Sarki, Uthman, & Stranges, 2015; Tadesse et al., 2019), predispõe à aterosclerose e os principais fatores de risco cardiovascular, como diabetes mellitus (DM) e hipertensão que resultam consequentemente em doença cardiovascular (Dimala & Blencowe, 2017).

Esses efeitos são particularmente evidentes em pacientes tratados com inibidores de protease. Os primeiros sinais de um risco aumentado de doença coronariana possivelmente relacionados aos IPs surgiram em 1998, com a publicação de relatórios de infarto do miocárdio ocorrendo em pacientes jovens infectados pelo HIV tratados com inibidores de protease e associados a concentrações elevadas de colesterol. (Henry et al., 1998; Vittecoq, Escaut, & Monsuez, 1998). No entanto, alguns estudos sobre o risco cardiovascular entre indivíduos infectados pelo HIV que recebem IPs não mostraram associação consistente. (Bavinger et al., 2013).

A patogênese da síndrome metabólica associada à terapia antiretroviral não foi completamente elucidada, mas há evidências crescentes de que um efeito sinérgico entre IPs e inibidores da transcriptase reversa nucleosídeo pode desempenhar um papel significativo.

Os ITRN têm efeitos adversos em longo prazo relacionados à sua toxicidade mitocondrial (Ganta & Chaubey, 2019). Os mecanismos de toxicidade mitocondrial e celular são complexos, destacando, entre outros, o fato de que esses medicamentos, além de inibirem a transcriptase reversa do vírus, podem inibir a gama DNA polimerase mitocondrial, resultando na síntese prejudicada de enzimas mitocondriais que geram ATP por fosforilação oxidativa (Venhoff, Setzer, Melkaoui, & Walker, 2007), gerando efeitos adversos como miopatia (zidovudina); neuropatia (estavudina, didanosina, zalcitabina); esteatose hepática e acidemia láctica (didanosina, estavudina, zidovudina); e possivelmente também lipoatrofia periférica (possivelmente todos os ITRN, embora predominantemente com estavudina); e pancreatite (didanosina). No geral, sua prevalência e gravidade aumentam com a terapia mais prolongada. (Venhoff N, 2007; Bernal, 2016; Ganta & Chaubey, 2019).

Até a data não há relatos importantes de toxicidade celular ou disfunções mitocondriais devido aos inibidores de integrase dolutegravir e raltegravir (Peñafigiel et al., 2017). Entre tanto, em um estudo longitudinal de mulheres com HIV em terapia antirretroviral, uma mudança para INIs foi associada a aumentos significativos no peso corporal, índice de massa corporal, porcentagem de gordura corporal e medidas de circunferência corporal em comparação com as que permaneceram em terapia antirretroviral sem INIs e há alguns relatórios de casos associando INIs com a ocorrência de hiperglicemia (Kerchberger et al., 2019).

A patogênese da dislipidemia relacionada à terapia antirretroviral é complexa e o mecanismo da dislipidemia induzida por IP não é totalmente compreendido, mas provavelmente é multifatorial e envolve vários efeitos induzidos por drogas, em associação com influências hormonais e imunológicas.

A dislipidemia ocorre em até 70% a 80% dos indivíduos HIV positivos que recebem terapia antirretroviral e está principalmente associada a medicamentos antirretrovirais específicos pertencentes a três classes de agentes antirretrovirais: ITRN, ITRNN e IP. Embora existam diferenças substanciais entre medicamentos individuais e também dentro das classes de medicamentos, a dislipidemia parece ser mais prevalente entre os pacientes que recebem IP (Calza et al., 2016).

Vários IP de primeira geração, por exemplo, indinavir e ritonavir em dose terapêutica são conhecidos por sua capacidade de induzir resistência à insulina e dislipidemia (Lee et al., 2007). As classes mais recentes de agentes antirretrovirais, incluindo os inibidores da integrase (raltegravir, elvitegravir e dolutegravir) e o antagonista do receptor CCR5 maraviroc, geralmente têm efeitos desprezíveis nas concentrações lipídicas em comparação com IP e efavirenz, e seu uso é muito raramente acompanhado pela ocorrência dislipidemia (Quercia, Roberts, Martin-Carpenter, & Zala, 2015; Sension & Deckx, 2015).

A lipodistrofia ou alteração na distribuição da gordura corporal é um dos principais efeitos colaterais da terapia antirretroviral caracterizada pela perda de gordura subcutânea, acúmulo de gordura visceral e desenvolvimento de uma corcova de búfalo (Bastard et al., 2002). Todas as classes de agentes antirretrovirais podem estar relacionadas ao desenvolvimento da lipodistrofia, mas a prevalência e a gravidade da lipodistrofia aumentam principalmente em pacientes tratados com a combinação de ITRN e um IP, gerada por efeitos inibitórios da droga para HIV na diferenciação de adipócitos

e alteração das funções mitocondriais (Brinkman, Smeitink, Romijn, & Reiss, 1999; Van Wijk & Cabezas, 2012).

As características metabólicas significativamente associadas à lipodistrofia e à terapia com inibidores de protease incluem hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, resistência à insulina e diabetes mellitus tipo 2 (Carr & Cooper, 2000).

A captura de AGL (ácidos graxos livres) dos adipócitos é prejudicada em pacientes com lipotrofia, e os tecidos não adiposos, como fígado, músculo esquelético e pâncreas, são expostos a concentrações excessivas de AGL (Van Wijk & Cabezas, 2012). Os AGL atingindo o fígado podem contribuir para um aumento na síntese de VLDL. Além disso, o comprometimento da depuração intestinal dos remanescentes de lipoproteínas ricas em TG (TRLs) está relacionado a um defeito na atividade da lipase lipoprotéica (LPL), especialmente, o uso combinado de ITRN e IP tem sido associado à diminuição da depuração dos TRLs.

A terapia antirretroviral resulta em níveis mais altos de lipoproteínas remanescentes pós-prandiais, independentemente do regime antirretroviral (Anuurad et al., 2008). A hiperlipidemia pós-prandial é considerada um fator de risco substancial para a aterosclerose, pois os TRLs hepáticos e intestinais e seus remanescentes se acumulam no espaço subendotelial, onde promovem aterosclerose pela formação de células espumosas (Alipour et al, 2008).

1.3. Antirretrovirais, disfunção endotelial e estresse oxidativo

Agentes antirretrovirais específicos podem aumentar o risco cardiovascular, interferindo na função endotelial (Van Wijk & Cabezas, 2012). A disfunção endotelial ou perda do relaxamento vascular dependente do endotélio em resposta a estímulos constitui um evento fisiopatológico precoce na aterogênese e doença cardiovascular. Tanto a infecção pelo HIV-1 quanto a terapia antirretroviral estão implicadas no desenvolvimento de disfunção endotelial; no entanto, as conclusões são frequentemente retiradas de associações mostradas em estudos epidemiológicos.

Em estudos principalmente *in vitro* e em animais, tem sido relatado que várias proteínas do HIV-1, citocinas pró-inflamatórias induzidas pelo HIV-1 e drogas antirretrovirais comuns têm impacto direto nas células endoteliais vasculares (Kline & Sutliff, 2008).

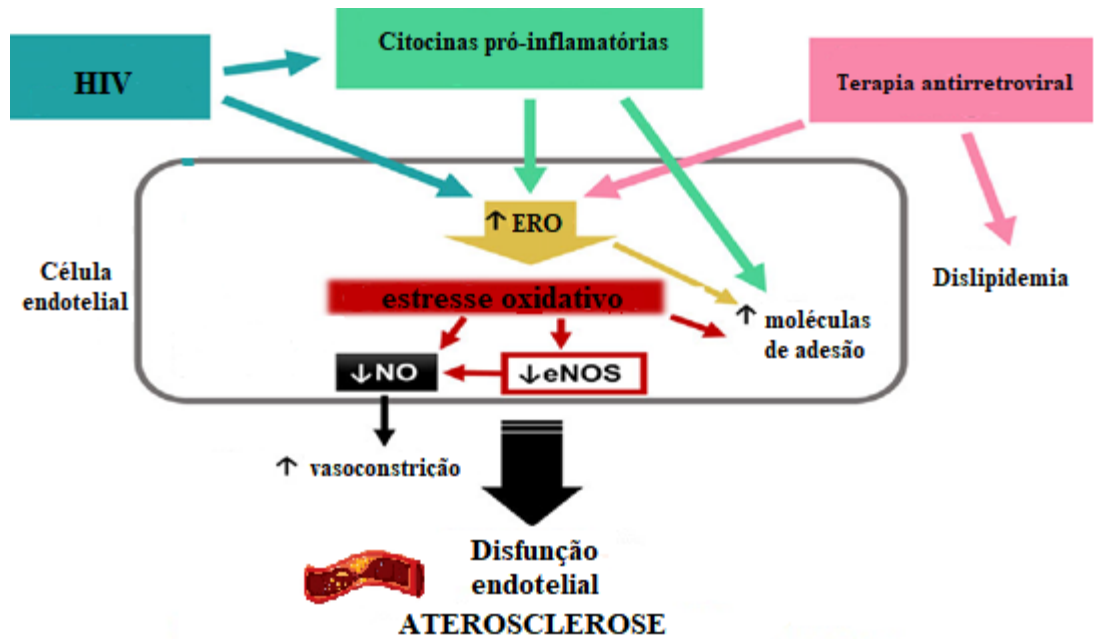


Figura 1. Representação esquemática dos efeitos da infecção pelo HIV-1 e seu tratamento em células endoteliais vasculares. Adaptado de Marincowitz et al., 2018.

Em condições fisiológicas o endotélio vascular age na regulação da homeostase vascular, produzindo vários fatores que regulam o tônus vascular, a adesão celular, a coagulação, a proliferação de células musculares lisas e a inflamação.

O óxido nítrico é um dos principais fatores sintetizados no endotélio vascular para manter a parede vascular em estado homeostático, exercendo efeitos benéficos como: relaxamento do músculo liso, inibição da adesão e a migração de leucócitos para a parede arterial, proliferação celular do músculo liso, adesão e agregação plaquetária, e expressão de moléculas de adesão.

O óxido nítrico (NO) é produzido a partir da L-arginina, pela enzima óxido nítrico sintase, que existe em três isoformas diferentes: endotelial (eNOS), neuronal (nNOS), e induzível (iNOS).

As NOS catalisam a produção de NO através da conversão da L-arginina e oxigênio molecular em L-citrulina e NO, na presença de NADPH como co-substrato e dos cofatores FMN, FAD e tetrahydrobiopterina (BH₄) (Förstermann & Sessa, 2012).

A redução na biodisponibilidade de NO tem sido apontada como a principal causa de disfunção endotelial que precede a doença vascular aterosclerótica. Essencialmente, uma redução na biodisponibilidade de NO leva a uma mudança na sinalização celular, levando o endotélio a um estado pró-inflamatório ativado, infiltração e captura de

partículas de lipoproteínas circulantes no espaço subendotelial, recrutamento de leucócitos para a íntima e subsequente diferenciação em macrófagos e finalmente células espumosas cheias de lipídios.

Na presença de estresse oxidativo, diminui a biodisponibilidade do óxido nítrico de duas maneiras, o NO reage com o superóxido para formar peroxinitrito, uma espécie reativa de nitrogênio prejudicial, reduzindo a biodisponibilidade do NO ou indiretamente, afetando a síntese de óxido nítrico produzindo o desacoplamento da eNOS esgotando o cofator tetrahydrobiopterina (BH4), gerando aumento da formação de ERO e diminuição dos níveis de NO (Gliozzi et al., 2019; Marincowitz et al., 2019).

Todas as células de mamíferos, incluindo células endoteliais, geram ânions superóxido ($O_2^{\cdot-}$), que são inativados principalmente por superóxido dismutases (SOD). As células endoteliais produzem constantemente baixos níveis de $O_2^{\cdot-}$, que aumentam significativamente quando as células são ativadas (Chatterjee & Catravas, 2008).

Se os níveis de superóxido aumentam significativamente, o NO reage com o $O_2^{\cdot-}$, e produz um oxidante potente, o peroxinitrito ($ONOO^-$). Em sistemas biológicos, isso leva à modificação de resíduos de tirosina para produzir 3-nitrotirosina. A formação de 3-nitrotirosina pode ser considerada um marcador biológico estável para a formação de peroxinitrito e é elevada em várias doenças cardiovasculares (Chatterjee & Catravas, 2008). A nitrotirosina é um marcador de dano peroxinitrito às proteínas e um indicador do estresse oxidativo.

O estresse oxidativo ocorre quando a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) excede a capacidade dos antioxidantes de eliminá-los e neutralizá-los. Como mencionado acima o radical superóxido, é produzido principalmente nas mitocôndrias como consequência dos processos metabólicos normais, sendo o radical primário de oxigênio produzido na célula e sua produção pode ser aumentada em condições patológicas (Glover et al., 2014; Madamanchi, Vendrov, & Runge, 2005).

As reações de redução-oxidação (ou redox) estão no centro de nossa maquinaria metabólica e envolvem a transferência de elétrons ou átomos de hidrogênio de um reagente para outro. (O processo de remoção de elétrons é chamado de "oxidação" e a substância que recebe elétrons se torna "reduzida") (McCord, 2000).

O produto de redução de um elétron do oxigênio é o radical superóxido, $O_2^{\cdot-}$. Se dois elétrons são transferidos, o produto é o peróxido de hidrogênio, H_2O_2 , que não é um

radical, mas é avidamente receptivo a mais dois elétrons, fazendo com que o peróxido de hidrogênio seja um oxidante citotóxico. O radical livre hidroxila é produzido a partir do peróxido de hidrogênio pelas reações de Fenton ou Haber-Weiss na presença de metais de transição catalítica ferro ou cobre (Phaniendra, Jestadi, & Periyasamy, 2015).

O radical livre de hidroxila, um dos oxidantes mais potentes conhecidos, pode iniciar a peroxidação lipídica, causar rupturas no DNA e oxidar indiscriminadamente praticamente qualquer molécula orgânica. A família de intermediários reativos resultantes da redução incompleta de oxigênio inclui, portanto, radical superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila (McCord, 2000).

As famílias de enzimas antioxidantes incluem superóxido dismutases para a eliminação do radical superóxido e catalases e glutathione peroxidases para a eliminação do peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos (Fukai & Ushio-Fukai, 2011; McCord, 2000).

Existem três formas principais de superóxido dismutases (SOD) que catalisam a conversão de superóxido em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio cada uma localizada em compartimentos intracelulares e extracelulares específicos: Cu / ZnSOD extracelular, MnSOD mitocondrial e Cu / ZnSOD citosólico. As SODs desempenham um papel crítico na inibição da inativação oxidativa do óxido nítrico, impedindo a formação de peroxinitrito e a disfunção endotelial e mitocondrial (Fukai & Ushio-Fukai, 2011).

A catalase, abundante nos peroxissomos, decompõe o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular, reduzindo conseqüentemente os danos induzidos por radicais livres. Nas mitocôndrias, a redução de peróxido de hidrogênio em água e peróxidos lipídicos em seus álcoois correspondentes é realizada pela glutathione peroxidase. As glutathione peroxidases são enzimas muito importantes na prevenção da peroxidação lipídica para manter a estrutura e a função das membranas biológicas (McCord, 2000).

Os radicais livres podem atacar uma grande variedade de componentes celulares, incluindo DNA, proteínas e lipídios, levando à oxidação do DNA e das proteínas, degradação proteica e peroxidação lipídica, aumentando a destruição da estrutura celular e a perda da função celular (Avunduk, Yurdakul, Erdemli, & Yavuz, 2003).

A peroxidação dos lipídios da membrana altera substancialmente as propriedades físicas das bicamadas lipídicas. Em particular, a peroxidação altera as interações lipídio-

lipídios, permeabilidade da membrana, gradientes de íons, fluidez da membrana e permeabilidade da membrana (Gaschler & Stockwell, 2017).

Com relação aos efeitos endoteliais dos antirretrovirais, uma função endotelial prejudicada foi demonstrada em humanos e ratos com o ITRN, Efavirenz (Faltz, Bergin, Pilavachi, Grimwade, & Mabley, 2017; Gupta et al., 2012). O aumento do estresse oxidativo celular e a superativação da enzima de reparo do DNA poli (ADP-ribose) polimerase (PARP) foram identificados como mediadores centrais da disfunção vascular. A superativação da PARP gerou supressão da atividade da eNOS através da depleção celular dos níveis de NAD e NADPH (Soriano, Pacher, Mabley, Liaudet, & Szabó, 2001). Portanto, é provável que estresse oxidativo mediado por efavirenz e subsequente ativação da PARP são responsáveis por prejudicar a atividade de eNOS e, portanto, o relaxamento vascular (Faltz et al., 2017).

Nas células endoteliais da veia umbilical humana, o tratamento com efavirenz resultou em um aumento da ERO, associada à indução de proteínas de choque térmico, estresse do retículo endoplasmático e autofagia (Weiß et al., 2016).

Estudos em animais demonstraram que vários ITRN como zidovudina e lamivudina induzem disfunção endotelial associada ao aumento do estresse oxidativo mitocondrial e da produção de ERO (Glover et al., 2014; Jiang et al., 2007).

O tratamento crônico com zidovudina e lamivudina reduziu os níveis de nitrito plasmático, diminuiu o vasorelaxamento dependente do endotélio e aumentou o estresse oxidativo em camundongos C57BL/6 e uma superexpressão de MnSOD ofereceu proteção contra reduções no relaxamento vascular dependente de endotélio (Glover et al., 2014). A produção de EROs em resposta a IP também resulta provavelmente do aumento do estresse oxidativo mitocondrial. Além disso, foi mostrada a capacidade de alguns IP de induzir disfunção mitocondrial e produção de ERO mitocondrial em fibroblastos e adipócitos humanos (Caron, Auclairt, Vissian, Vigouroux, & Capeau, 2008; Lagathu et al., 2007).

Em outros trabalhos publicados mostraram que vários inibidores de protease como o ritonavir geram aumento do estresse oxidativo, diminuição da função endotelial através da redução da expressão da eNOS nas artérias coronárias e carótidas porcinas e nas células endoteliais da artéria pulmonar humana (Conklin et al., 2004; Chai et al., 2005; Wang, Chai, Lin, Yao, & Chen, 2009).

As evidências atuais sugerem que na terapia antirretroviral de primeira escolha atualmente recomendada, a lamivudina pode gerar disfunção endotelial, mas o Tenofovir não tem sido associado à disfunção endotelial (Glover et al., 2014).

1.4. Terapia antirretroviral e doença hepática gordurosa não alcoólica

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é reconhecida como o componente hepático da síndrome metabólica, pois essa condição está fortemente associada a diabetes mellitus tipo 2 e à obesidade abdominal e a um risco aumentado de desenvolver doenças cardiovasculares (Bhatia *et al.*, 2012; Younossi *et al.*, 2019). Clinicamente, pacientes com DHGNA tendem a ter componentes de síndrome metabólica (42.54%), como obesidade (51.34%), diabetes mellitus tipo 2 (22.51%), dislipidemia (69.16%) e hipertensão (39,34%) (Younossi *et al.*, 2019; Younossi *et al.*, 2016).

As complicações relacionadas ao fígado continuam sendo uma das principais causas de mortalidade entre os pacientes infectados pelo HIV, apesar dos avanços no tratamento do HIV e da hepatite viral. Especialmente, o impacto da doença hepática gordurosa não alcoólica é significativo, com uma prevalência de até 30% (Chromy *et al.*, 2019).

A patogênese da DHGNA e os motivos da progressão para esteato-hepatite não alcoólica (EHNA) ainda não estão totalmente elucidados, mas a resistência à insulina, disfunção mitocondrial e dislipidemia parecem ser os principais fatores. Tanto a própria infecção pelo HIV quanto a terapia antirretroviral podem contribuir para o desenvolvimento de DHGNA / EHNA de várias maneiras. O uso de inibidores da transcriptase reversa nucleosídeos de primeira geração e inibidores de protease está associado ao desenvolvimento de DHGNA / EHNA (van Welzen *et al.*, 2019).

Como foi relatado certas terapias antirretrovirais podem contribuir para o desenvolvimento da DHGNA de duas maneiras diferentes. Primeiro, vários medicamentos antirretrovirais causam alterações metabólicas desfavoráveis, como dislipidemia e resistência à insulina (Dekkers et al., 2018). Segundo, o uso de certos medicamentos antirretrovirais está associado à disfunção mitocondrial. Como falado anteriormente os NRTIs de primeira geração são mais comumente associados a disfunção mitocondrial e tanto a resistência à insulina quanto a dislipidemia podem ser o resultado

da disfunção mitocondrial no tecido adiposo periférico e no fígado (Kakuda *et al.*, 1999). As mitocôndrias hepáticas desempenham um papel essencial na oxidação dos AGL. No cenário da disfunção mitocondrial, as mitocôndrias são incapazes de processar essa oxidação, levando a um acúmulo local de triglicerídeos, gerando a DHGNA.

Atualmente a doença hepática gordurosa não alcoólica é reconhecida como a doença hepática crônica mais prevalente no mundo, com uma prevalência global de 25,2%. A DHGNA é definida como a presença de $\geq 5\%$ de esteatose hepática, detectada por imagem ou histologia, na ausência de etiologias concorrentes da doença hepática, como hepatite viral crônica, uso de medicamentos que induzem esteatose e outras doenças hepáticas crônicas.

A DHGNA tem um espectro de doença hepática progressiva que engloba esteatose simples, um 10% desses pacientes pode desenvolver esteato-hepatite não alcoólica EHNA, definida histologicamente pela presença de esteatose hepática com evidência de dano hepatocitário, um 25-35% dos pacientes progride para fibrose e, finalmente, cirrose e eventualmente, 10% dos pacientes com cirrose pode desenvolver carcinoma hepatocelular (Farrell & Larter, 2006; Younossi *et al.*, 2016).

A gordura se acumula no fígado de pacientes com DHGNA principalmente na forma de triglicerídeos. Os triglicerídeos derivam da esterificação de glicerol e ácidos graxos livres (AGL). Uma vez sintetizados, os triglicerídeos entram em pools de armazenamento ou secretórios. Os AGL derivam da dieta ou do tecido adiposo via lipólise e / ou da lipogênese hepática. Uma vez nos hepatócitos, os AGL sofrem atividade da acil-CoA sintase e formam acil-CoA, que podem entrar nas vias de esterificação ou β -oxidação (Jacome-Sosa & Parks, 2014).

A resistência à insulina é considerada a mecanismo chave no desenvolvimento da esteatose, porque contribui para acumulação de triglicerídeos. A insulina normalmente suprime a atividade da enzima lipase hormônio-sensível (HSL). A HSL está presente em todos os adipócitos e é capaz de hidrolisar triglicerídeos em ácidos graxos livres (AGL), na resistência à insulina a supressão da HSL é diminuída, resultando em um aumento da hidrólise no tecido adiposo periférico e, portanto, um aumento na entrega de AGL ao fígado (Xia *et al.*, 2017). No fígado, os AGL sofrem esterificação em triglicerídeos contribuindo para o processo de esteatose e a síntese de lipídios no fígado é aumentada no cenário da DHGNA (van Welzen *et al.*, 2019).

A resistência à insulina também promove disfunção do tecido adiposo com consequente produção e secreção alteradas de adipocinas e citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-6, que também contribuem para manter o estado de resistência à insulina. No fígado, a resistência à insulina amplifica a lipogênese hepática de novo. O aumento do fluxo de ácidos graxos hepáticos derivados dos processos acima e de uma atividade alterada do microbiota intestinal leva a duas situações diferentes: síntese e acúmulo de triglicerídeos (TG) e níveis 'tóxicos' de ácidos graxos, colesterol livre e outros metabólitos lipídicos que causam disfunção mitocondrial com estresse oxidativo e produção de ERO e estresse no retículo endoplasmático (ER), todos levando à inflamação hepática.

Fatores genéticos ou modificações epigenéticas afetam o conteúdo de gordura dos hepatócitos, os processos enzimáticos e o ambiente inflamatório hepático, influenciando o risco de progressão para inflamação e fibrose (NASH) ou persistência em estágio estável da doença (DHGNA)(Buzzetti *et al.*, 2016; Crum-Cianflone *et al.*, 2011).

2. JUSTIFICATIVA

Estudos com modelos celulares, animais e humanos sugerem que os inibidores de integrase apresentam menor impacto cardiometabólico que os inibidores de transcriptase reversa e os inibidores de protease. Contudo, não há dados consistentes na literatura demonstrando as ações cardiovasculares e metabólicas dos inibidores de integrase, particularmente do DTG. Estes estudos são necessários tendo em vista o uso recente, porém crescente, do DTG como primeira opção de terapia antirretroviral. Desta forma, nós hipotetizamos que o uso subcrônico do DTG induz alterações cardiovasculares, hepáticas e sobre o perfil lipídico de camundongos C57BL/6, não infectados com HIV.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

O objetivo do presente trabalho foi estudar o impacto da administração subcrônica do inibidor de integrase dolutegravir (DTG) sobre o sistema cardiovascular, perfil lipídico, função hepática e estresse oxidativo em camundongos selvagens C57BL/6J.

3.2. Objetivos Específicos

- a) Avaliar o efeito do dolutegravir no perfil lipídico sérico e glicemia dos camundongos C57BL/6J.
- b) Avaliar as alterações histopatológicas e no perfil lipídico hepático induzidas pelo DTG.
- c) Avaliar o efeito do dolutegravir sobre o *status oxidativo* hepático pela análise de peroxidação lipídica e atividade de enzimas antioxidantes.
- d) Avaliar o efeito do DTG sobre o perfil eletrocardiográfico dos animais.
- e) Avaliar o efeito do dolutegravir sobre a morfologia cardíaca.
- f) Avaliar a contribuição da via eNOS e nNOS na função vascular das aortas dos animais sob tratamento com DTG, em sistema de órgãos isolados.
- g) Avaliar a produção de NO, H₂O₂ e de radicais superóxido e expressão de proteínas envolvidas no controle do NO e no estresse oxidativo em aortas dos animais tratados com DTG, por imunofluorescência.
- h) Avaliar o efeito do DTG sobre a pressão arterial dos animais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Modelo animal e tratamento

Foram utilizados camundongos selvagens C57BL/6J, machos com 10 a 12 semanas de vida. Os animais foram mantidos no Biotério de Criação Enio Cardillo Vieira do ICB-UFMG. Todos os animais tiveram livre acesso à ração e água e foram mantidos em gaiolas coletivas em ambiente com ciclos de luminosidade de 12 horas e com temperatura controlada a $23 \pm 2,0$ °C. Foi administrada aos animais ração comercial para roedores NUVILAB®.

Os animais foram tratados por gavagem (1 administração diária) com 10mg/kg de DTG ou o mesmo volume do veículo (água) durante 28 dias.

Para a conversão mais apropriada de dose terapêutica usada em humanos para estudos em animais, usamos o método de normalização da área de superfície corporal (body surface area (BSA)) baseado nas diretrizes da FDA (Reagan-Shaw *et al.*, 2008). Desta forma, chegamos à dosagem de 10mg/kg para administração aos camundongos.

Este projeto foi aprovado pelo comitê de ética da UFMG sob protocolo CEUA número 394/2018 (Anexo).

4.2. Coleta de tecidos

Após indução anestésica com Cetamina 100mg/kg e Xilazina 10mg/kg, o sangue dos animais foi coletado por punção femoral, em tubos sem anticoagulante para análise de componentes séricos. Para os experimentos de reatividade vascular, as aortas torácicas foram cuidadosamente dissecadas e transferidas para uma placa de Petri contendo solução de Krebs-Henseleit (composição em mM: NaCl 110,8; KCl 5,9; NaHCO₃25,0; MgSO₄1,07; CaCl₂2,49; NaH₂PO₄2,33; glicose 11,51; pH=7,4). Para alguns experimentos, as aortas, coração e fígado foram coletados em criotubos e congelados imediatamente em nitrogênio líquido para análise posterior. Para análises histopatológicas, coração e fígado foram fixados em paraformaldeído 4% (pH 7.4), para posterior análise.

4.3. Determinação dos níveis séricos de colesterol, triglicérides, glicose, TGO e TGP

Após coleta do soro dos animais, foram realizadas as seguintes análises: Glicose usando glicosímetro (OneTouch® UltraMini™), Colesterol total, HDL, triglicérides, usando kits colorimétricos comercialmente disponíveis (Labtest, códigos: 76-2/100 ,13-50 e 87-2/250) e as análises da transaminase glutâmica pirúvica (TGO) e transaminase glutâmica oxalacética (TGP) (Bioclin, códigos K034-1 e K035-1:), de acordo com instruções do fabricante.

4.4. Análises morfométricos

Após o sacrifício dos animais o coração e o fígado foram retirados, cuidadosamente lavados em PBS, fixados em paraformaldeído a 4% (em PBS) e posteriormente incluídos em parafina para posterior microtomia (5 µm). Os cortes foram então processados para confecção das lâminas e corados com hematoxilina e eosina, para exames ao microscópio óptico.

Os Cortes histológicos do fígado foram avaliados e classificados de acordo com os critérios publicados para análise de magnitude de esteatose e inflamação (Gonçalves *et al.*, 2017; Wang, Seitz, & Wang, 2010).

Foi feito o score de esteatose, classificado de 0 a 4 com base na porcentagem média de hepatócitos com acúmulos de gordura por campo. Foram avaliados campos ampliados 200x (Objetiva de 20x) corados com H&E.

Tabela 1. Score de esteatose.

Score	% media de hepatócitos com acúmulo de gordura
0	<5%
1	5-25%
2	26-50%
3	51-75%
4	>75%

O score de inflamação foi classificado de 0 – 3 com base no número de células inflamatórias infiltrando o parênquima por cm². Foram avaliados campos ampliados 200x (Objetiva de 20x) corados com H&E.

Tabela 2. Score de inflamação.

Score	Número de células inflamatórias infiltrando o parênquima por cm ²
0	0
1	1 a 2/20x
2	2 ~ 4/20x
3	> 4/20x

Para obtenção dos dados morfométricos cardíacos, imagens de cortes das seções histológicas do ventrículo esquerdo foram capturadas através de uma microcâmera (Spot Basic 3.4.5) adaptada ao microscópio BX41TF Olympus com uma objetiva de 60X (magnificação final = 600x). A análise foi realizada usando o software FIJI com Image J2.

4.5. Determinação de colesterol e triglicérides hepáticos

Os lipídeos totais hepáticos foram extraídos com o uso de solventes orgânicos de acordo com o método de Folch et al., 1957, 100mg de fígado foram triturados, durante 3 minutos, com 1900µL de solução de clorofórmio: metanol (2:1), usando-se homogeneizador de tecidos. Os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 3.000rpm, após adição de 400µL de metanol. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de ensaio com peso conhecido e posteriormente acrescido 800µL de clorofórmio e 640µL de solução de NaCl a 0,73%. Após nova centrifugação por 10 minutos a 3.000rpm, foi desprezada a fase superior. A parede interior de cada tubo foi lavada 3 vezes com 600µL de solução de Folch (solução de 3% de clorofórmio, 48% de metanol, 47% de água e 2% de NaCl a 0,2%). Os extratos lipídicos obtidos foram secos em estufa *overnight* a 37 °C, e os lipídeos quantificados gravimetricamente. Os extratos lipídicos foram ressuspensos em 500µL de isopropanol para a determinação dos níveis de colesterol total e triglicérides

usando kits colorimétricos comercialmente disponíveis (Labtest, códigos: 76-2/100 e 87-2/250), de acordo com instruções do fabricante..

4.6. Avaliação do estresse oxidativo no fígado

O estresse oxidativo hepático foi inferido através das análises da atividade das enzimas antioxidantes catalase e superóxido dismutase e dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

4.6.1. Avaliação da atividade da Catalase

A atividade da catalase foi inferida de acordo com protocolo de Aebi, 1984, com algumas modificações. Em resumo, as amostras de fígado foram homogeneizadas em tampão fosfato 50mM (pH 7,0) e centrifugadas a 12000rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido e os homogenatos do fígado foram dispostos em uma cubeta de quartzo com tampão fosfato 50 mM (pH 7,0) e H₂O₂ (0,3M). A atividade da catalase foi medida pelo decaimento da absorbância do H₂O₂ a 240 nm por um minuto utilizando espectrofotometria. Os cálculos foram feitos pela diferença de leitura no tempo final pelo tempo inicial, dividido pelo volume (mL) da amostra. O resultado é expresso por concentração de proteína (mg/mL), dosada pelo método de Lowry *et al.*, 1951.

4.6.2. Avaliação da atividade da SOD

A atividade da SOD foi inferida pela análise da auto-oxidação do pirogalol de acordo com protocolo de Dieterich, et al., 2000, com algumas modificações. As amostras de fígado foram processadas da mesma forma como descrito para atividade da catalase. O sobrenadante foi recolhido e foi plaqueado 30 µL em duplicata, seguido da adição de 99 µL de tampão fosfato, 6µL de MTT (brometo de dimetiltiazol-difeniltetrazolium) e 15 µL de pirogalol a 100µM; para o branco, o pirogalol foi substituído por tampão fosfato e para o padrão, a amostra foi substituída por tampão fosfato. Após cinco minutos de incubação a 37°C, a reação foi parada com 150µL de DMSO (dimetil sulfóxido), sendo a leitura realizada a 570nm. Uma unidade de atividade enzimática é a taxa que inibe 50%

da auto-oxidação do pirogalol conforme determinado pela mudança da absorbância/min a 570 nm. O teor de proteína foi mensurado pela técnica de Lowry *et al.*, 1951, e a atividade da SOD foi expressa em unidades/mg de proteína.

4.6.3. Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS):

A mensuração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico foi realizada em microplacas de 96 poços, de acordo com o protocolo de Wallin *et al.*, 1993. Os tecidos hepáticos (100mg) foram homogeneizados em 1,0 mL de PBS e mantidos no gelo durante todo o processo. O volume de 250µL do homogenato de cada amostra foi colocado em tubos de ensaio, onde foi adicionado 500µL da solução TBARS: ácido tricloroacético (TCA) 15% p/v, ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,0375% p/v e HCl 0,25N (6,25mL de HCl 4N para 100mL). As amostras foram então mantidas em banho-maria ferventes por 15 minutos e então colocadas sob água corrente até esfriarem. Foi adicionado aos tubos 750µL de álcool butílico, que foram, então, vigorosamente agitados. Após uma centrifugação a 3000rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi recolhido e plaqueado em duplicata; sendo a leitura realizada a 535nm. Uma curva padrão com o malondialdeído (MDA) foi construída. O resultado foi normalizado pela concentração de proteínas dos tecidos, e foi expresso em µmol de MDA/g de proteína. As proteínas foram mensuradas pela técnica de Lowry *et al.* 1951.

4.7. Avaliação Eletrocardiográfica

Para medir os parâmetros do eletrocardiograma, como a frequência cardíaca, o intervalo PR, a duração do complexo QRS e o intervalo QT- corrigido, 25 a 26 dias após início de tratamento com dolutegravir ou veículo, os camundongos são anestesiados por via inalatória com isoflurano em dose de 3-5% (indução), 1-2% (manutenção), eletrodos adaptados são colocados na região subcutânea dos quatro membros dos animais e conectados a um módulo de aquisição de ECG para computador (TEB Tecnologia Eletrônica Brasileira Ltda), para posterior análise eletrocardiográfica.

4.8. Reatividade vascular sistema de banho de órgãos isolados

A montagem dos anéis de aorta torácica foi feita conforme descrito pelo nosso grupo (L. Capettini *et al.*, 2008; L. S. Capettini, Cortes, & Lemos, 2010). Os animais tratados com DTG ou grupo controle foram sacrificados por decapitação, a aorta torácica foi cuidadosamente removida, retirando-se o excesso de tecido adiposo. A artéria foi cortada em anéis de aproximadamente 2-3 mm. Para obtenção do registro de tensão isométrica, esses anéis foram montados em cubas para órgão isolado contendo solução de Krebs-Henseleit (em mmol/L: NaCl, 118,3; KCl, 4,7; MgSO₄, 1,2; KH₂PO₄, 1,2; CaCl₂, 2,5; NaHCO₃, 25; glicose, 11,1), aerada continuamente com mistura carbogênica (95% de O₂ + 5% de CO₂), mantida à temperatura de 37°C e pH=7,4. Duas hastes metálicas triangulares foram passadas através do lúmen do vaso. Um dos triângulos foi fixado na base, e o outro conectado verticalmente a um transdutor de tensão isométrica. Após a montagem, os anéis aórticos foram submetidos a uma tensão de repouso de 0,5 g, regulada na primeira hora do experimento para estabilização da preparação. Durante esse período, a solução nutritiva foi trocada a cada 15 minutos, objetivando-se, dessa forma, evitar o acúmulo de metabólitos, como também a restauração dos níveis de glicose necessários ao metabolismo vascular. Os registros experimentais foram feitos com o uso de transdutores de tensão isométrica (World Precision Instruments, Inc., USA), conectados a um amplificador TBM4M, WPI, sendo este acoplado a um computador equipado com uma placa conversora analógico-digital utilizando-se o programa Windaq Data Acquisition (Dataq® Instruments, USA) para aquisição e análise dos dados experimentais.

Curvas concentração-resposta cumulativas à acetilcolina (10⁻⁹ a 10⁻⁴ mol/L) foram construídas, em vasos contendo endotélio funcional (>80%) pré-contraídos com fenilefrina 10⁻⁷mol/L, e seus efeitos foram comparados nas diferentes situações experimentais. A participação do NO e do H₂O₂ endoteliais na disfunção endotelial nos animais sob tratamento com DTG foram analisadas em experimentos realizados na presença de L-NAME (inibidor não seletivo das NOS, 300μM), em preparações contendo endotélio funcional. Objetivou-se, desta forma, avaliar o impacto do tratamento com o DTG sobre o relaxamento mediado pelas NOS ou ainda o efeito destes tratamentos sobre a contração mediada pela fenilefrina em aortas. Para avaliar o efeito do superóxido no relaxamento vascular induzido pela acetilcolina os anéis de aorta foram incubados com

MnTMPyP (10 μ M), um mimético de SOD. A contratilidade vascular foi avaliada com curvas concentração-resposta cumulativa à fenilefrina (10^{-9} a 10^{-5} mol/L). Os resultados de relaxamento vascular foram expressos como percentual de relaxamento e os resultados de contração como mN do vaso.

4.9. Microscopia de fluorescência

Para os experimentos de microscopia de fluorescência, os segmentos das aortas foram embebidos em meio para congelamento de tecidos (Tissue-Tek OCT Compound; Sakura®, USA), congelados em nitrogênio líquido e posteriormente cortados a 8 μ m em criostato.

As lâminas contendo os cortes de aortas foram incubadas com sonda fluorescente intracelular para o NO (4-Amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein, DAF-FM, 5 μ mol/L; Invitrogen, USA), para H₂O₂ (dihydrodichlorofluorescein diacetate, H₂-DCF-DA, 5 μ mol/L; Invitrogen, USA), ou para superóxido (dihydroethidium, DHE, 5 μ mol/L; Invitrogen, USA) em PBS por 30 minutos no escuro e lavados duas vezes com PBS. Após a incubação, as lâminas foram montadas usando meio de montagem com DAPI - Prolong gold mounting media (Invitrogen, USA) para visualização dos núcleos.

Para a imunolocalização de eNOS e nNOS no endotélio, as lâminas das aortas foram fixadas com acetona gelada, lavadas duas vezes com PBS, permeabilizadas e bloqueadas com tampão de bloqueio (Triton X-100 a 0,1% e BSA 1% em PBS) durante 1 hora, seguido da incubação com os anticorpos primários anti-eNOS (1:100; policlonal feito em coelho, SC654; Santa Cruz Biotecnologia, USA,) e anti-nNOS (1:100; monoclonal feito em camundongo, SC5302; Santa Cruz Biotecnologia, USA) por 12 horas a 4°C. Em seguida foi realizada a incubação com anticorpo secundário anti-coelho CFL488, SC362260 (1:200) e anti-camundongo CFL 647, SC362286 (1:200) (Santa Cruz Biotecnologia, USA) por 2 horas à temperatura ambiente. As aquisições das imagens foram realizadas em microscópio Zeiss ApoTome2 no Centro de aquisição e processamento de imagens (CAPI) do ICB-UFMG. A intensidade de fluorescência foi analisada e corrigida pela densidade integrada e pela área selecionada.

4.10. Imunohistoquímica para nitrotirosina

Os cortes de aorta incluídos em OCT foram tratados com peróxido de hidrogênio 3% para bloquear a atividade da peroxidase endógena. Foi feito o bloqueio dos sítios inespecíficos com a solução Protein Block Serum-free (Dako). As lâminas foram incubadas por 2 horas com anticorpo anti-nitrotirosina (1:100) (Sigma-Aldrich, código N5663068k0555) em câmara úmida. Após a incubação com o anticorpo primário, foi feita a incubação com polímero de segunda etapa: EnVision™+Dial Link System-HRP (Dako), durante 1 hora à temperatura ambiente. Para evidenciar as áreas imunorreativas os cortes foram incubados com substrato cromógeno (Liquid DAB + substrate Chromogem System) por 5 minutos. Após contra coloração com Hematoxilina de Harris (Sigma®) por 25 segundos as lâminas foram montadas e analisadas em microscópio óptico em um aumento de 200x. A intensidade de imunorreatividade foi medida utilizando o programa Image-pro plus.

4.11. Avaliação da pressão arterial

A medida da pressão arterial sistólica foi determinada indiretamente pelo método de pletismografia de cauda nos dias 25 a 26 de tratamento. Inicialmente foi realizado um protocolo para adaptação dos camundongos ao sistema LE 5002 Non-Invasive Blood Pressure meter. Após tal período, a pressão arterial de cada animal, acordado, adaptado, foi aferida, utilizando-se 10 ciclos de medidas e a média aritmética foi calculada.

4.12. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Graph Pad Prism 7.0. Os dados obtidos resultados expressos por gráficos de barras foram comparados pelos testes t de *Student* para dados paramétricos, pelo teste Mann-Whitney para dados não paramétricos ou pelo método one-way ANOVA. Assumiu-se a significância quando $p < 0,05$. Os resultados de relaxamento vascular foram representados

como o percentual de redução de contração em resposta à acetilcolina. Os dados de contração, por sua vez, foram expressos em mN/mm, considerando a força desenvolvida pelo vaso e o comprimento do anel. As curvas concentração-resposta cumulativas foram analisadas ponto-a-ponto através do método two-way ANOVA para medidas repetidas, seguidas de testes de comparação do tipo BONFERRONI. Os valores de EC50 foram determinados através de regressão não linear das curvas obtidas nos experimentos, representando a concentração da droga que produziu 50% da redução da contração ou do relaxamento e o $E_{m\acute{a}x}$ foi a resposta máxima de relaxamento ou contração.

5. RESULTADOS

5.1. GLICEMIA E PERFIL LIPIDICO SÉRICO.

A administração de DTG não induziu alterações da glicemia de jejum, quando comparado ao controle (Figura 2).

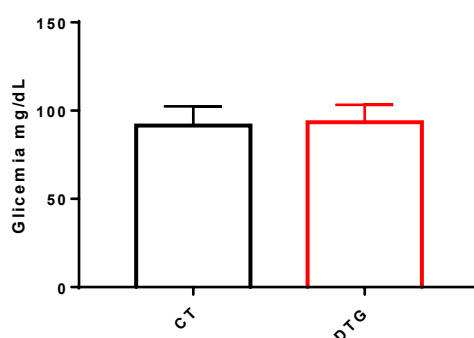


Figura 2. Glicemia de jejum. (A). As barras representam média \pm erro padrão; (A) n=6-8 por grupo; Teste t de students ($p>0.05$ sem diferença estaticamente significativa).

O tratamento com Dolutegravir também não alterou os níveis séricos de colesterol (Figura 3A), da fração HDL do colesterol (Figura 3B), do colesterol não-HDL; Figura 3C) nem de triglicerídeos (Figura 3D).

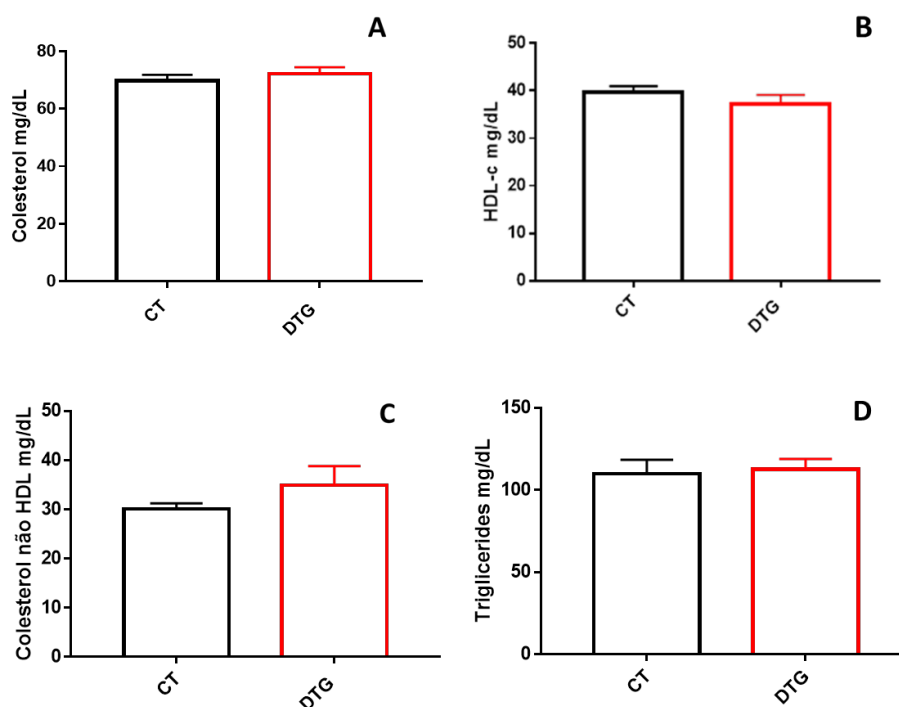


Figura 3. Perfil lipídico sérico. (A) Colesterol total (mg/dL). (B) fração HDL do colesterol (mg/dL). (C) Colesterol não HDL. (D) triglicerídeos (mg/dL). As barras representam média \pm erro padrão; n=6-8 por grupo. Teste t de *students* ($*p<0.05$).

5.2. PARÂMETROS HEPÁTICOS

5.2.1. *Transaminases hepáticas*

Foram avaliadas as transaminases de interesse clínico, transaminase glutâmica oxalacética (TGO) e transaminase glutâmica pirúvica (TGP). O tratamento com Dolutegravir não aumentou significativamente os níveis de TGO (Figura 4A), mas aumentou significativamente os níveis séricos da TGP (Figura 4B), sugerindo lesão hepática.

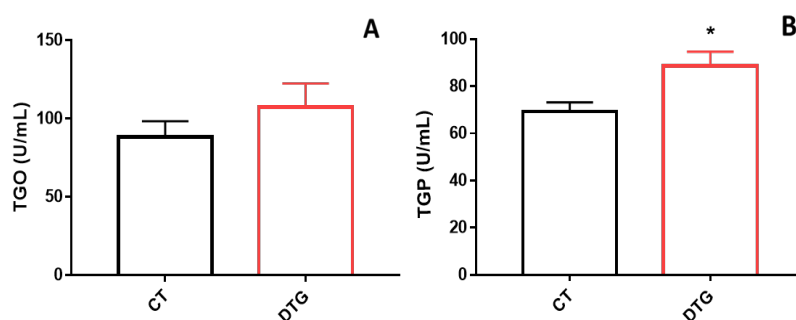


Figura 4. Transaminases hepáticas. (A) TGO. (B) TGP. As barras representam média \pm erro padrão; (A) $n=6-8$ por grupo; Teste t de *students* ($*p<0.05$).

5.2.2. *Histopatologia hepática*

Os fígados dos animais tratados com DTG apresentaram alterações na avaliação histopatológica: dentro destas se destacam a degeneração de tipo esteatose microvesicular, além de um aumento no infiltrado de linfócitos, como mostram as figuras representativas dos grupos CT e DTG (Figura 5).

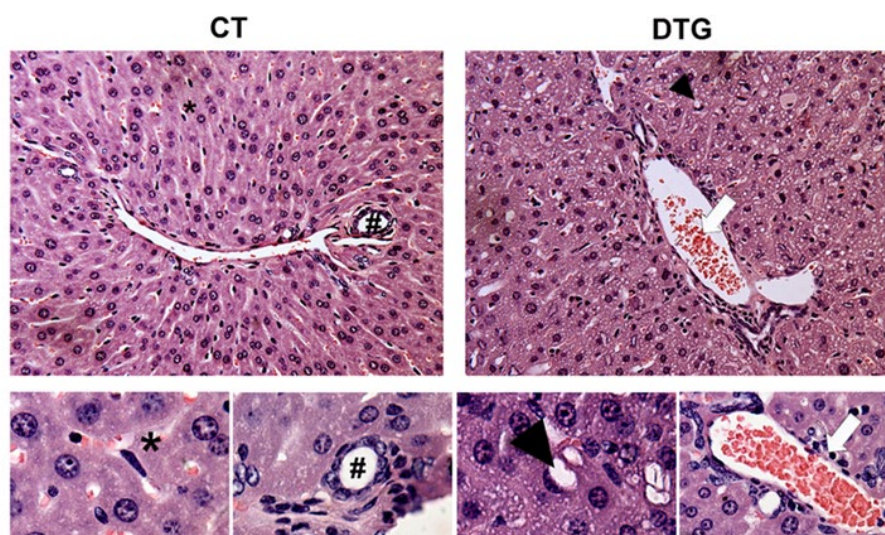


Figura 5. Cortes histológicos de fígado corados com hematoxilina e eosina. No grupo CT observaram-se características típicas do órgão. Hepatócitos formando cordões entremeados pelos sinusoides hepáticos. O espaço porta com características histológicas normais. Marcado com *: macrófagos hepáticos (células de Kuffer). Marcado com #: túbulo. No Grupo DTG: espaço porta evidenciando marcada degeneração hidrópica e esteatose. Marcado com cabeça de seta: célula em anel de sinete típica da esteatose onde os vacúolos lipídicos deslocam o núcleo à periferia. As setas brancas mostram congestão hemática.

5.2.3. *Score de esteatose*

Observou-se um score de 1 em todos os animais do grupo tratado com Dolutegravir, correspondendo a um 5- 25% dos hepatócitos com esteatose hepática (Figura 6).

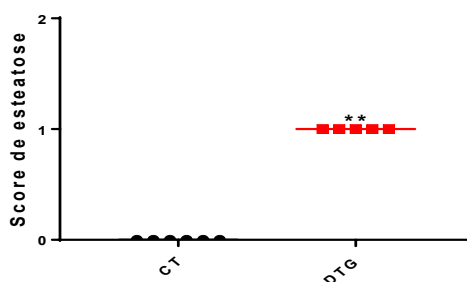


Figura 6. Score de esteatose em cortes de fígados corados com H&E. N=5-6. Teste Mann Whitney (* $p < 0.05$).

5.2.4. *Score de inflamação*

Encontrou-se um score de 1 no grupo tratado com Dolutegravir, correspondendo a 1 a 2 células inflamatórias infiltrando o parênquima por cm^2 .

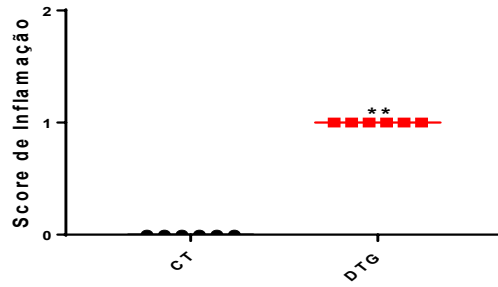


Figura 7. Score de inflamação em cortes de fígados corados com H&E. N=6. Teste Mann Whitney (* $p < 0.05$).

5.2.5. Concentração de lipídios hepáticos

Os fígados dos camundongos tratados com Dolutegravir apresentaram um aumento significativo na concentração de lipídios totais (Figura 8A) e de triglicérides (Figura 8C). Contudo, não houve aumento significativo do conteúdo hepático de colesterol (Figura 8B).

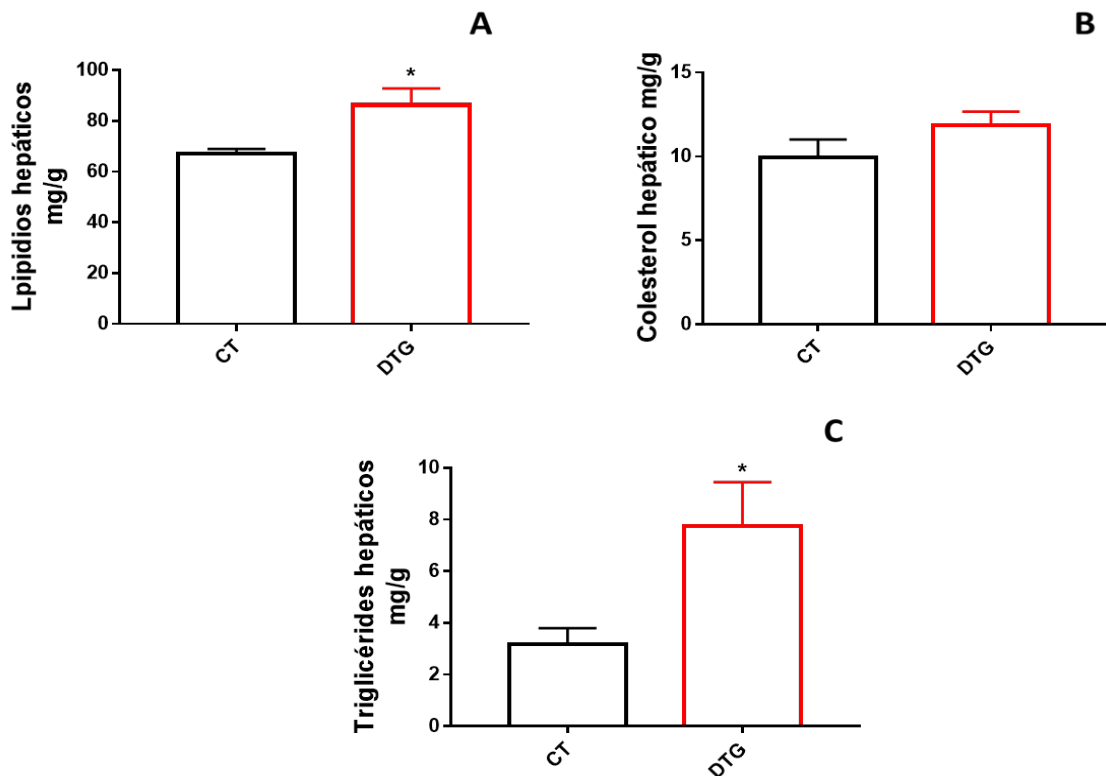


Figura 8. Concentração de lipídios hepáticos. (A) Lipídios hepáticos totais (mg/g). (B) Colesterol hepático (mg/g). (C) Triglicérides hepáticos (mg/g). As barras representam média \pm erro padrão; n=6-8 por grupo. Teste Mann-Whitney e teste t de *students* (* $p < 0.05$).

5.3. AVALIAÇÃO DO *STATUS* OXIDATIVO HEPÁTICO

A fim de se avaliar o *status* oxidativo no fígado, foram quantificadas as concentrações de malondialdeído (MDA), uma das principais substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e importante produto da peroxidação lipídica, assim como a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase. O Dolutegravir, foi capaz de aumentar, a concentração de MDA (Figura 9A) e diminuir a atividade enzimática da SOD (Figura 9B). Não foi encontrada diferença entre os grupos quanto à atividade enzimática da catalase (Figura 9C).

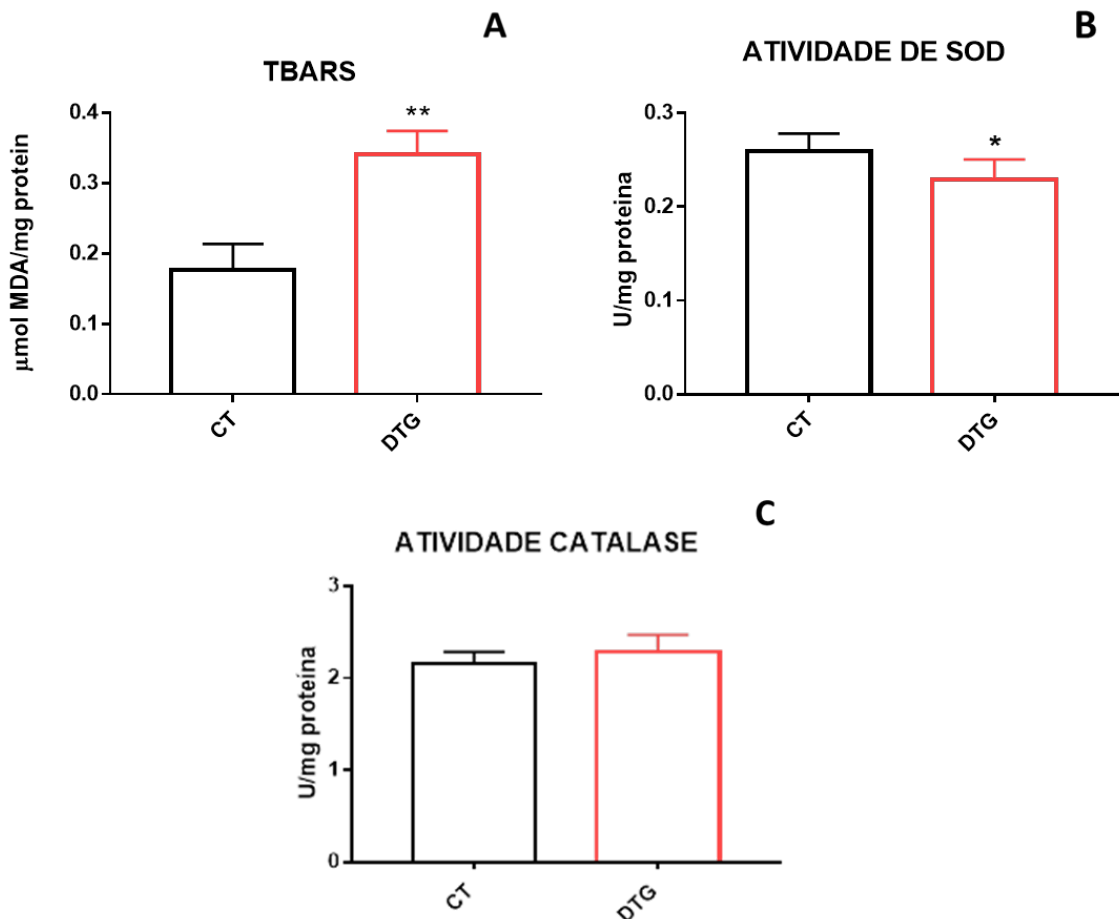
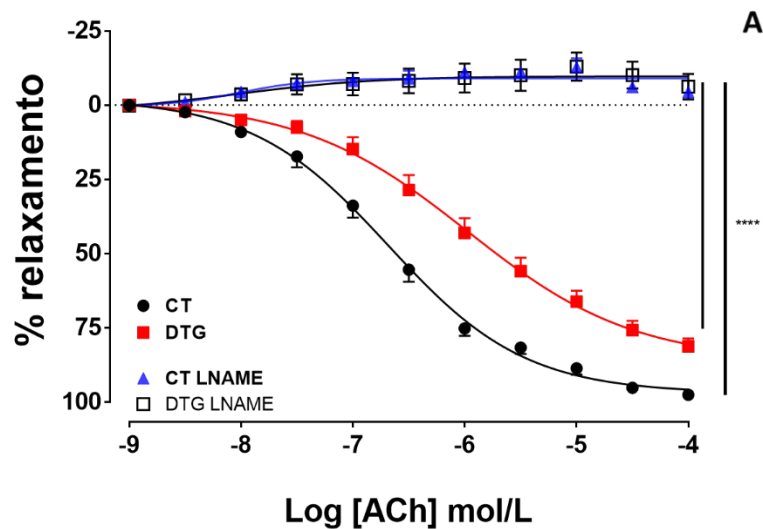


Figura 9. Status oxidativo hepático. (A) Peroxidação lipídica no fígado avaliada através da dosagem de TBARS. (B) Atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD). (C) Atividade enzimática da catalase. As barras representam média \pm erro padrão; $n=6-8$ por grupo. Teste t de *students* (* $p<0.05$).

5.4. REATIVIDADE VASCULAR SISTEMA DE BANHO DE ÓRGÃOS ISOLADOS

5.4.1. Efeito do DTG no relaxamento vascular induzido pela acetilcolina

Foram realizadas curvas de concentração resposta cumulativa a Acetilcolina, em anéis de aorta torácica pré-contraídos com fenilefrina na presença de endotélio funcional, observando-se uma diminuição da resposta máxima no grupo tratado com Dolutegravir (Figura 10A; $E_{máx}$ CT: $93,09 \pm 1,7$ %, $N=12$; $E_{máx}$ DTG: $79,0 \pm 2,5$ %, $N=16$). Posteriormente foi avaliada a contribuição do NO através da inibição não-seletiva das NOS com L-NAME. O L-NAME aboliu o efeito relaxante da acetilcolina nos grupos experimentais (Figura 10A; $E_{máx}$ CT+L-NAME: $-9,18 \pm 0,9$ %, $N=5$, $E_{máx}$ DTG+L-NAME: $-11,2 \pm 5$ %, $N=5$). Contudo, a análise do delta das áreas sob a curva dos grupos controle e DTG mostram que o delta do grupo DTG é menor, sugerindo uma menor participação do NO no relaxamento induzido pela ACh ou uma disfunção endotelial pela deficiência da via do NO (Figura 10B).



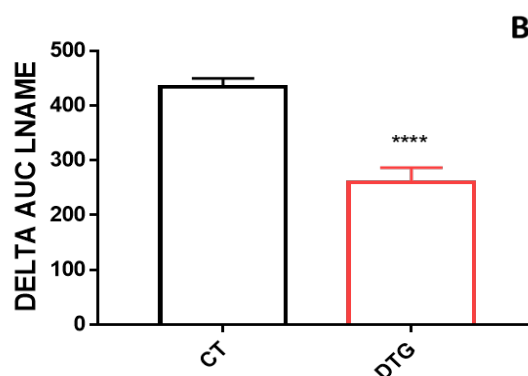


Figura 10. Efeito do DTG no relaxamento vascular induzido pela acetilcolina. (A) Curvas de resposta vasodilatadora a Ach (10-9-10-4mol / L) em anéis de aorta de camundongos controle e tratados com DTG incubados ou não com L-NAME. (B) Delta AUC L-NAME. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão. Para reatividade vascular (n = 16-5), as percentagens médias de relaxamento (curvas Ach) foram comparadas por análise de variância (ANOVA a dois fatores). * Representa uma diferença significativa (*** p <0,001 quando comparado ao CT) (** p <0,01 quando comparado ao CT).

5.4.2. Efeito do superóxido no relaxamento vascular induzido pela acetilcolina

O MnTMPyP é um mimético de SOD, permeável a membrana celular. Assim sendo, atua reduzindo a biodisponibilidade de superóxido (O_2^-). Para avaliar a contribuição do superóxido na diminuição do relaxamento induzido por acetilcolina anéis de aorta torácica foram incubados por 10 minutos com MnTMPyP, posteriormente pré-contraindo com fenilefrina e foram realizadas curvas de concentração resposta cumulativa a Acetilcolina na presença de endotélio funcional. Não foi observada melhora significativa da resposta máxima no grupo tratado com Dolutegravir (Emax DTG: 79,04 \pm 2,4 %, N=16 e Emax DTG MnTMPyP: 86,43 \pm 7,0, n=5), assim como no grupo controle (Emax CT: 93,09 \pm 1,7 %, N=12 e Emax CT MnTMPyP: 95,51 \pm 2,5 N=5), sugerindo que a redução no relaxamento no grupo DTG não foi devido a um aumento na produção de radicais superóxido (Figura 11).

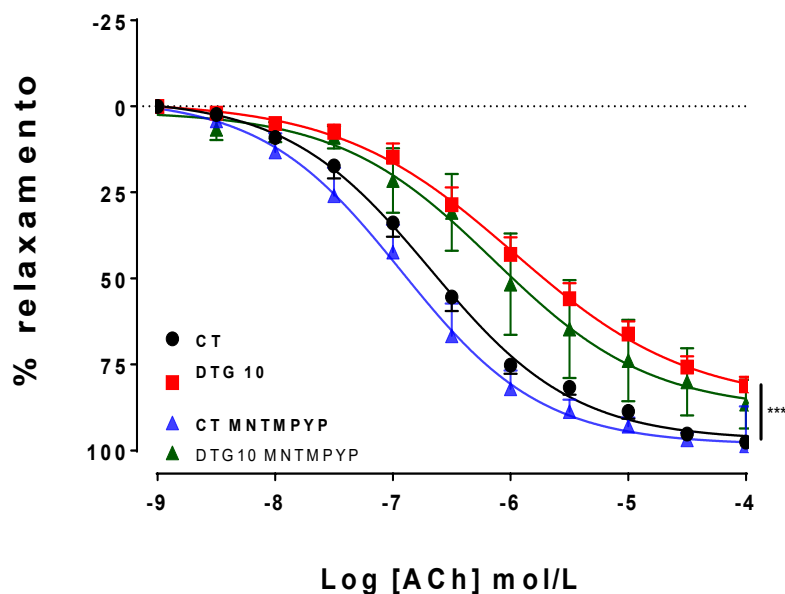


Figura 11. Efeito do superóxido no relaxamento vascular induzido pela acetilcolina. (A) Curvas de resposta vasodilatadora a Ach (10^{-9} - 10^{-4} mol / L) em anéis de aorta torácica de camundongos controle e tratados com DTG incubados ou não com MnTMPyP. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão. Para reatividade vascular (n = 16-5), as percentagens médias de relaxamento (curvas Ach) foram comparadas por análise de variância (ANOVA a dois fatores). * Representa uma diferença significativa (**** p <0,0001, ***p<0,001, ** p<0,01, quando comparado ao CT).

Tabela 3. Valores de Emáx dos resultados dos experimentos de relaxamento vascular.

Fármacos	Controle	DTG
ACh	93,7 \pm 1,7 % ***	79,0 \pm 2,4%
ACh + L-NAME	-9,1 \pm 0,9 %	-11,2 \pm 5,0 %
ACh + MNTMPYP	95,5 \pm 2,5 %	86,4 \pm 7,0 %

Os resultados são expressos como média \pm erro padrão. Para reatividade vascular (n= 16-5), (*** p <0,001 quando DTG Ach comparado ao CT Ach). Teste t de *students*.

5.4.3. Efeitos do tratamento com DTG na contratilidade vascular

O próximo passo foi avaliar se o tratamento com DTG geraria alterações na contratilidade induzida pela fenilefrina. Curvas concentração-resposta de fenilefrina foram construídas na ausência e presença do L-NAME (300 μ M). O DTG não foi capaz de alterar o padrão de contração induzida pela fenilefrina (Figura 12). Para valores de (Emáx CT: 2,7 \pm 0,2 %, N=9 e Emáx DTG: 2,4 \pm 0,2, N=13, Emáx CT+ L-NAME: 3,8 \pm 0,6 %, N=7 e Emáx DTG+L-NAME: 3,0 \pm 0,2 N=11).

Contudo, o L-NAME aumentou a contração induzida por Fenilefrina de maneira mais acentuada no controle do que nos tratados com DTG (Figura 12).

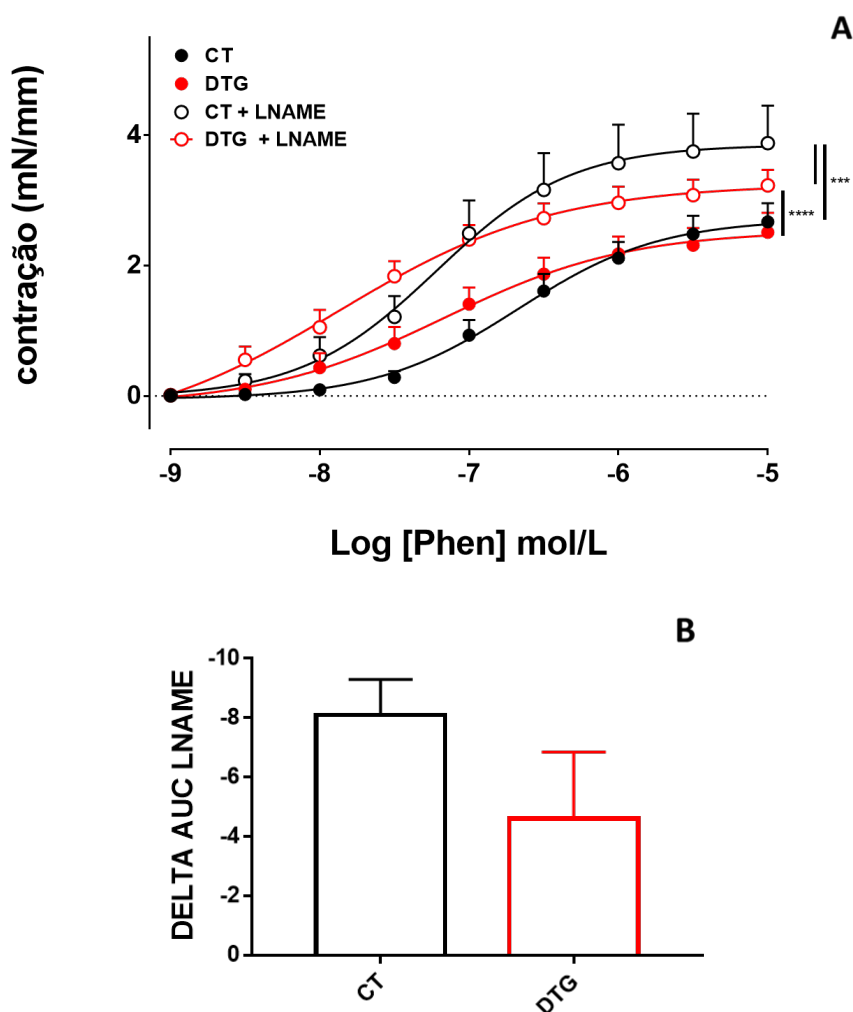


Figura 12. (A) Curvas de resposta vasoconstritora induzida por fenilefrina no controle (n=9), tratado com DTG (n= 13), controle + LNAME (n= 7), DTG + L-NAME (n= 11). (B) Delta AUC L-NAME. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão. Para reatividade vascular, as percentagens médias foram comparadas por análise de variância (ANOVA a dois fatores). * Representa uma diferença significativa (**** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, quando comparado ao CT). Para Delta AUC L-NAME Teste t de *students* (* $p < 0,05$).

Tabela 4. Valores de Emáx dos resultados dos experimentos de contração vascular.

	Controle	DTG
Fenil	2,7 \pm 0,2 %***	2,4 \pm 0,2 %**
Fenil + L-NAME	3,8 \pm 0,6 %***	3,0 \pm 0,2 %

Os resultados são expressos como média \pm erro padrão. Para reatividade vascular (n = 13-7), (*** $p < 0,001$ quando CT Fenil comparado ao CT Fenil+L-NAME e quando

CT Fenil+L-NAME comparado ao DTG Fenil+L-NAME, $**p < 0,01$ quando DTG Fenil comparado ao DTG Fenil+L-NAME). Teste t de *students*.

5.5. Produção de NO, superóxido e peróxido de hidrogênio.

Baseados nesses dados, resolvemos investigar a produção de óxido nítrico, superóxido e peróxido de hidrogênio na aorta dos animais controle e tratados com Dolutegravir, por microscopia de fluorescência usando as sondas seletivas para estas espécies reativas. O tratamento com DTG levou a uma diminuição na disponibilidade de NO (Figura 13A), mas não houve diferença na disponibilidade de superóxido (Figura 13B) e peróxido de hidrogênio (Figura 13C), o que suporta os nossos achados de reatividade vascular.

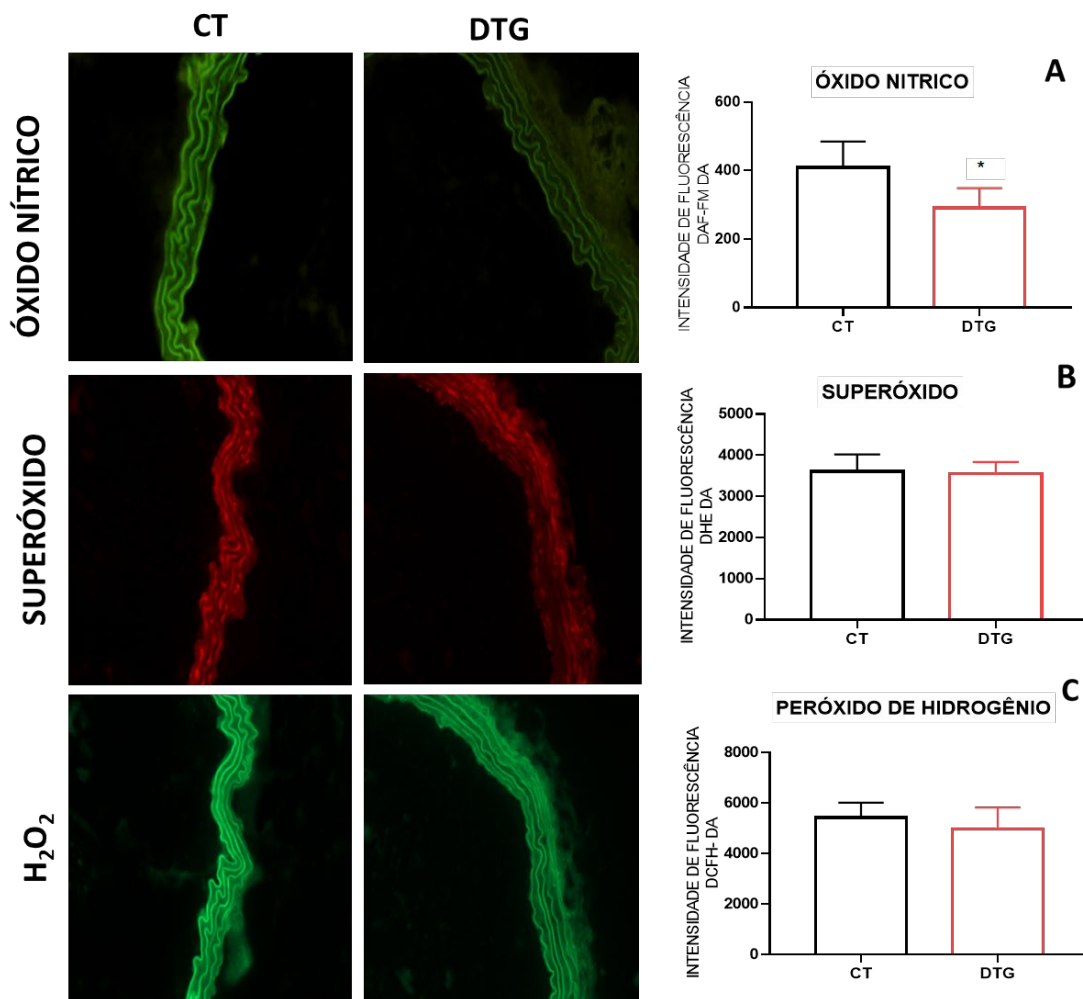


Figura 13. Medidas da produção de NO, superóxido, H₂O₂ por fluorescência em cortes de aorta torácica de animais tratados com DTG e controles. (A) Intensidade de fluorescência do DAF-FM. (B) Intensidade de fluorescência do DHE –DA. (C) Intensidade de fluorescência do DCFH-DA. Dados expressos em unidades arbitrárias de fluorescência e as barras representam média \pm erro padrão; n=5 por grupo. Teste t de *students* (* $p < 0.05$).

5.6. Imunodeteccção de eNOS e nNOS por microscopia de fluorescência em cortes de aorta torácica

Posteriormente avaliamos a expressão da eNOS e nNOS por imunofluorescência nos cortes de aortas. Os experimentos de imunofluorescência demonstram que há diminuição na expressão de ambas, eNOS (Figura 14A) e nNOS (Figura 14B), na camada endotelial da aorta dos animais tratados com DTG.

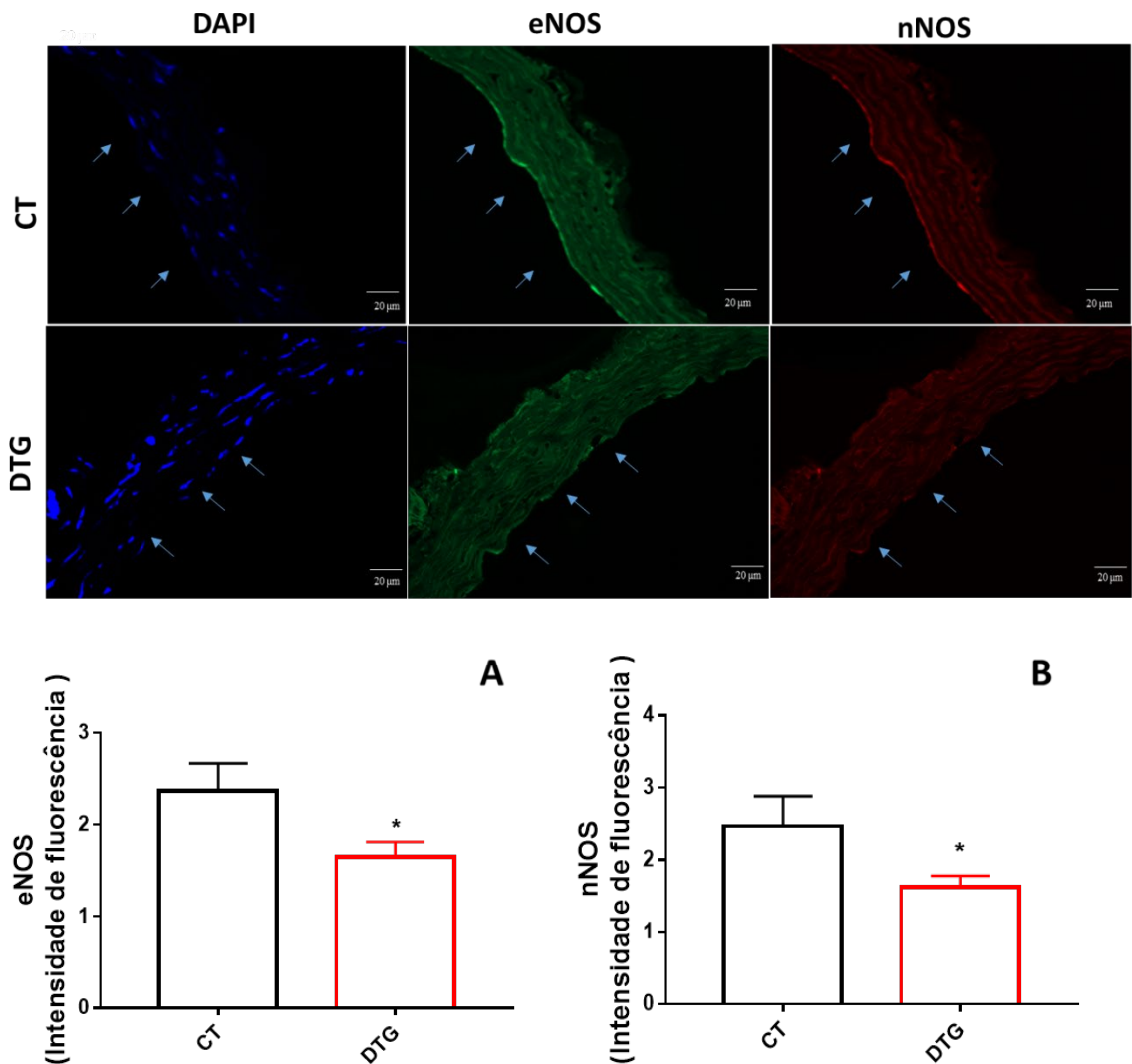


Figura 14. Determinação da expressão de eNOS e nNOS por imunofluorescência em cortes de aorta torácica de animais tratados com DTG e controles. (A) Intensidade de fluorescência de eNOS (B) Intensidade de fluorescência de nNOS. Dados expressos em unidades arbitrárias de fluorescência e as barras representam média \pm erro padrão; n=5 por grupo. Teste t de *students* (* $p<0.05$).

5.7. Medida da produção de nitrotirosina por imunohistoquímica

A nitrotirosina é um marcador de dano causado pelo peroxinitrito às proteínas e um indicador do estresse oxidativo. A expressão de nitrotirosina foi analisada pela técnica de imunohistoquímica. Nós observamos um aumento significativo da marcação para nitrotirosina no grupo tratado com DTG (Figura 15), sugerindo que, além da redução da expressão das NOS, a redução do NO e conseqüente redução do relaxamento poderia envolver a produção de peroxinitrito.

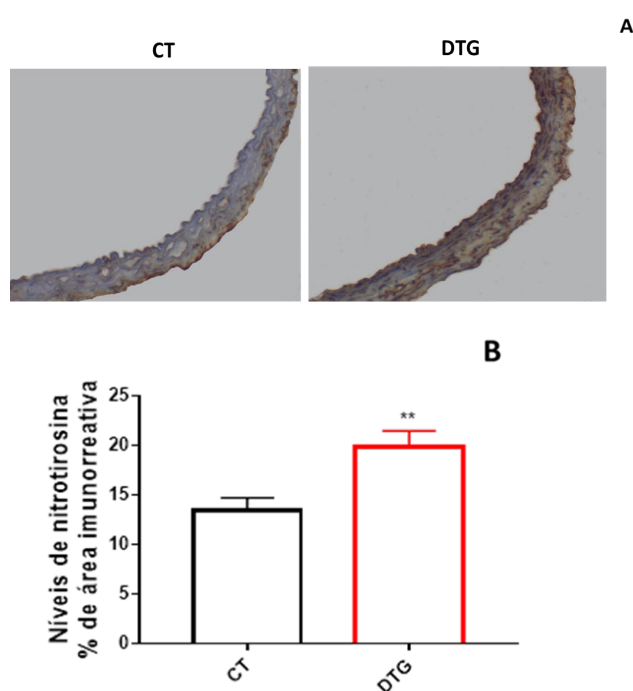


Figura 15. Determinação da produção de nitrotirosina por imunohistoquímica em cortes de aorta torácica de animais tratados com DTG e controles. (A) Imagens representativas da imunohistoquímica para nitrotirosina em aorta dos grupos experimentais. (B) Níveis de nitrotirosina, os valores em porcentagem de área marcada representam a expressão de nitrotirosina nos cortes de aorta torácica. Os dados representam a média \pm erro padrão (n=4 para cada grupo). Teste t de *students* (*p<0.05).

5.8. Pressão arterial sistólica

Foi feita a mensuração da pressão arterial sistólica caudal e os valores, são apresentados na Figura 16. Foi verificado que os grupos de animais controle e DTG não apresentaram diferenças significativas entre si.

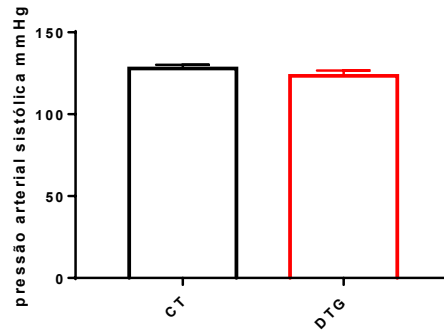


Figura 16. Pressão arterial sistólica de camundongos tratados com DTG e controles. Valores expressos em médias \pm EPM (n=7 – 8). Teste t de *students* (*p<0.05).

5.9. Avaliação eletrocardiográfica

Para avaliar o efeito do tratamento com Dolutegravir nas propriedades elétricas cardíacas, sinais eletrocardiográficos foram registrados. Traçados representativos do eletrocardiograma são observados na Fig. 17A. Não houve diferença significativa nos intervalos PRi, QTc, duração do QRS nem na frequência cardíaca entre os grupos (Fig. 17C-17F).

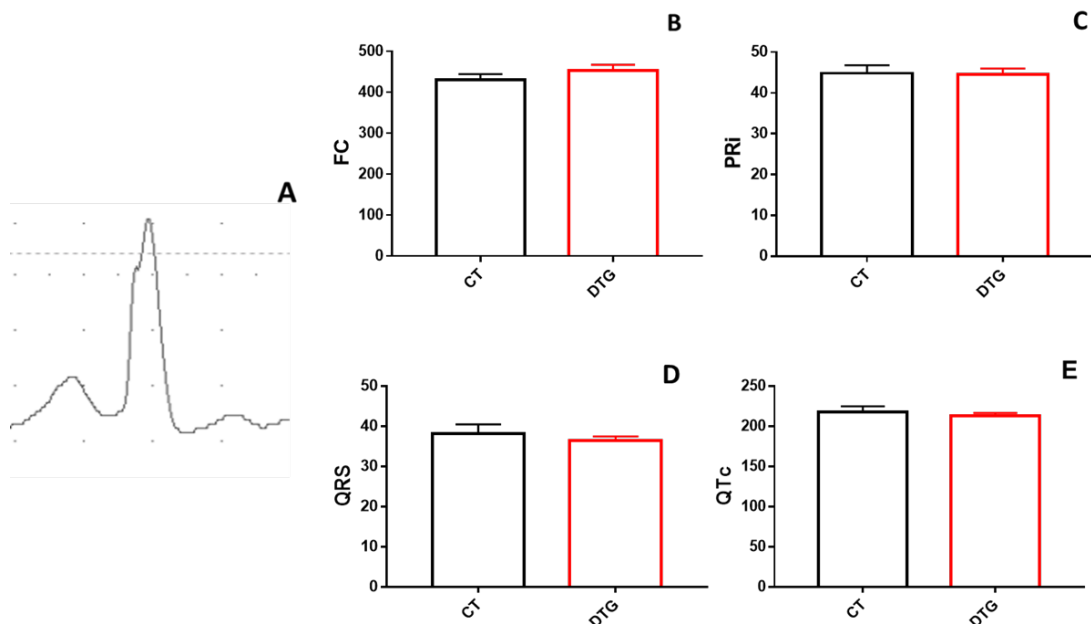


Figura 17. Traçados representativos do eletrocardiograma. (A) Eletrocardiograma com morfologia normal, Eletrocardiograma com ondas P, complexo QRS e T normais, de um animal do grupo tratado. (B). Frequência cardíaca. (C) Intervalo PR. (D) Duração do complexo QRS. (E) intervalo QTc. As barras representam média \pm erro padrão; n=6-12 por grupo. Teste t de *students* (*P<0.05).

5.10. Histopatología cardíaca

Foram avaliados cortes histológicos corados com HE de coração para determinar a presença de alterações na morfologia e disposição dos cardiomiócitos e não se observaram diferenças significativas entre os grupos (Figura 18). Foi mensurada a área celular, constatando que não houve diferença entre os grupos .

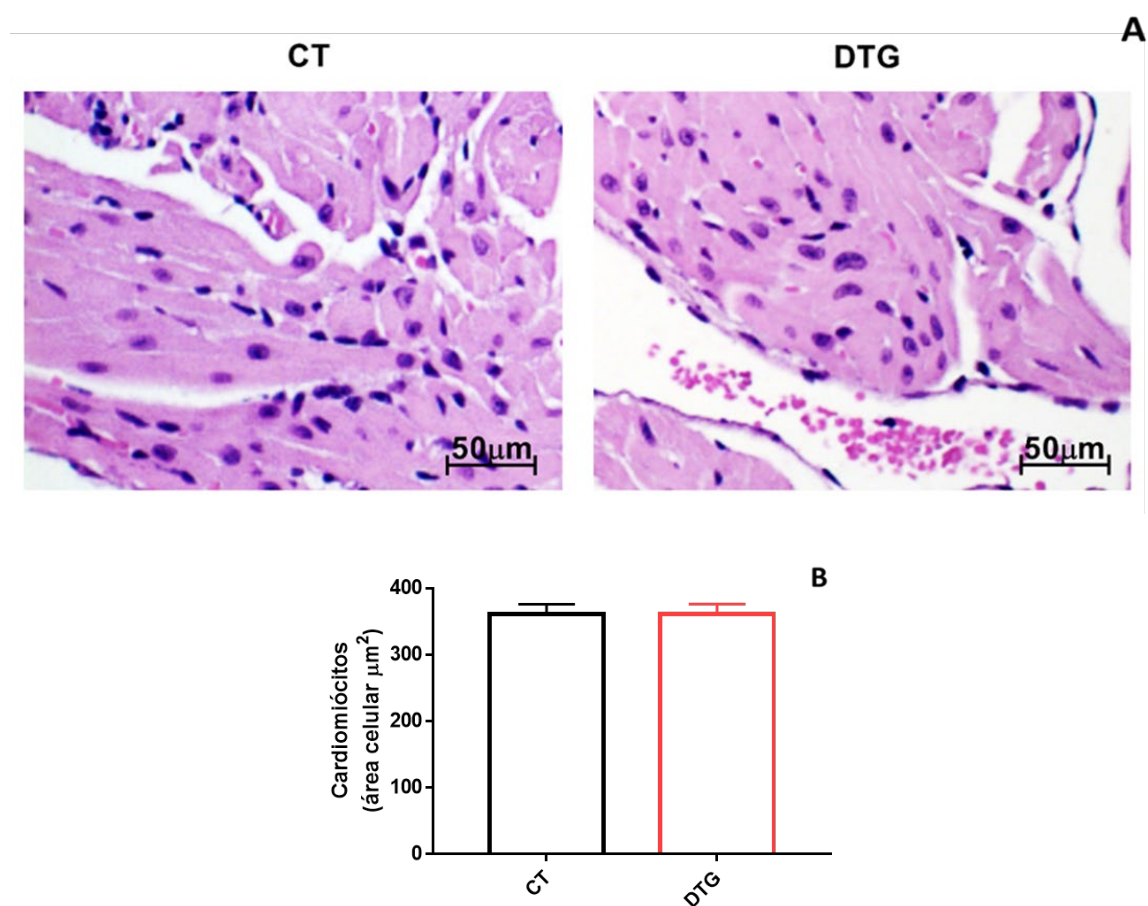


Figura 18. (A) Cortes histológicos de coração corados com hematoxilina e eosina. Observa-se a arquitetura do tecido cardíaco normal nos grupos controle e tratado com Dolutegravir. (B) Área celular dos cardiomiócitos (n = 4).

6. DISCUSSÃO

A doença cardiovascular é uma importante causa de morbimortalidade em pessoas com vírus da imunodeficiência humana . O risco de doença cardiovascular aterosclerótica é maior na pessoas vivendo com HIV em comparação às pessoas não infectadas (Feinstein *et al.*, 2019). A prevenção cardiovascular em pacientes infectados pelo HIV é um desafio tanto para cardiologistas quanto para médicos envolvidos no tratamento/controla da infecção.

No presente estudo, investigamos os efeitos cardiometabólicos do medicamento antirretroviral Dolutegravir (DTG) disponível comercialmente, em um modelo de camundongos C57BL/6.

O Dolutegravir é um inibidor de integrase recente e faz parte de vários regimes iniciais preferenciais de TARV para a maioria das pessoas com HIV desde 2017. Frequentemente os pacientes têm substituído terapias antirretrovirais antigas para terapias que incluem o Dolutegravir, por seus inúmeros benefícios como alta potência, menor toxicidade e alta barreira genética.

O perfil lipídico sérico dos animais neste estudo foi avaliado ao término do experimento e encontramos que o DTG não alterou os níveis de colesterol total, colesterol HDL, fração aterogênica nem triglicérides dos animais quando comparados com o grupo controle. Nossos dados confirmam as observações iniciais sugerindo um efeito mínimo do dolutegravir e outros inibidores da integrase nos lipídios séricos em humanos (Ofotokun *et al.*, 2015; Quercia *et al.*, 2015).

Foi demonstrado anteriormente que certos tipos de ITRN e de IP poderiam induzir resistência à insulina *in vitro* e *in vivo* (Honnapurmath & Patil, 2017). Em nosso trabalho, observamos que o tratamento de camundongos C57BL/6 com dolutegravir por 4 semanas não tem efeitos nos níveis de glicose plasmática. Os INIs tem sido pouco associados a resistência à insulina, no entanto, existem relatos de casos associando INIs como o dolutegravir e raltegravir a hiperglicemia, o que foi melhorado após interrupção da droga (Fong *et al.*, 2017; McLaughlin *et al.*, 2018). Os mecanismos pelos quais os INIs podem ter efeitos metabólicos não são conhecidos.

Em nosso estudo, foi observada infiltração gordurosa hepática semelhante à DHGNA, nos camundongos tratados com DTG por 4 semanas, em associação com

aumento dos níveis de triglicérides hepáticos e da TGP sérica. A TGP é produzida principalmente no fígado sendo um melhor indicador para avaliação da integridade celular hepática que a TGO (Giannini *et al.*, 2005).

A toxicidade hepática tem sido associada a terapias com outros antirretrovirais como os ITRN e é reconhecido que alguns dos IP podem atuar diretamente nos hepatócitos e interferir em muitas vias metabólicas lipídicas (Flint *et al.*, 2009). Estudos *in vitro* e *in vivo* indicam que os IP estimulam a síntese de novo de triglicérides, ácidos graxos e colesterol nas células hepáticas, o que causa, conseqüentemente, hepatomegalia e esteatose (Riddle *et al.*, 2001; Riddle *et al.*, 2002) e essas anormalidades, foram especialmente pronunciadas após a alimentação com uma dieta rica em gorduras do tipo ocidental. Embora os INIs, e particularmente o DTG ainda não tenha sido considerado hepatotóxico, nossos camundongos tratados com DTG exibiram TGP elevada em comparação com os controles e esse aumento evidencia a ocorrência de lesão hepática causada pelo DTG. Com um aumento significativo na concentração de lipídeos totais, particularmente dos triglicerídeos, os quais são o componente principal das lesões de esteatóticas, características da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA).

Esse achado é importante como fator de risco cardiovascular, tendo em vista a relação entre doença hepática gordurosa e doença cardiovascular. A DHGNA é atualmente considerada um fator de risco independente no desenvolvimento da doença cardiovascular. Evidências associam a DHGNA com disfunção endotelial, aumento da velocidade da onda de pulso, aumento da calcificação arterial coronariana e aumento da espessura da íntima-media carotídea, todos marcadores estabelecidos para doença cardiovascular (Francque *et al.*, 2016).

Alguns estudos também relataram a associação de níveis aumentados de TGP e doença cardiovascular (Schindhelm *et al.*, 2007; Yun *et al.*, 2009) sugerindo que, em pacientes sem hepatite viral ou consumo excessivo de álcool, a maioria com DHGNA, aqueles com TGP elevado tinham um risco mais alto de doença cardiovascular do que aqueles com atividade normal de TGP (Ioannou *et al.*, 2006).

Em nosso estudo, a peroxidação lipídica hepática também foi elevada no grupo tratado com DTG, indicando estresse oxidativo hepático. Todos esses eventos ainda são intensificados pela redução da atividade das enzimas antioxidantes, como a SOD o que torna o tecido hepático mais vulnerável. Vários antirretrovirais têm sido associados com um aumento do estresse oxidativo que não se limita ao endotélio, já os ITRN

demonstraram a capacidade de induzir estresse oxidativo no cérebro, rim, fígado e outros tecidos (Glover *et al.*, 2014).

Durante os experimentos de reatividade vascular, realizamos curvas-concentração resposta à acetilcolina e fenilefrina, verificando que o DTG alterou a resposta de relaxamento, mas não alterou a contração vascular mediada por fenilefrina. Nossos dados estão em concordância com alguns estudos que também demonstraram diminuição do relaxamento sem alteração da resposta contrátil após tratamento *ex vivo* com efavirenz (Faltz *et al.*, 2017).

Posteriormente avaliamos a via das NOS através do uso do inibidor não seletivo LNAME, e observamos que, como esperado, o L-NAME aboliu a resposta vasodilatadora em aortas dos animais tratados ou não com DTG. Contudo, o delta da área sob a curva foi menor no grupo tratado sugerindo uma menor produção de óxido nítrico nesse grupo. Nossos achados indicam que o DTG induz disfunção endotelial, mas não está claro se essas diferenças são devidas a mecanismos tóxicos adicionais ou simplesmente a um maior grau de estresse oxidativo.

Os achados no presente estudo parecem resultar de um declínio na biodisponibilidade de NO. Esse efeito pode ser resultante de uma redução na biossíntese de NO, uma vez que houve diminuição da expressão de eNOS e nNOS, bem como de uma inativação do NO por superóxido, levando a produção de peroxinitrito. Portanto, é provável que estresse oxidativo mediado por DTG seja responsável por prejudicar a atividade de eNOS, nNOS e, portanto, o relaxamento vascular. Além disso, não sabemos por quais mecanismos o DTG leva a redução da expressão das NOS na camada endotelial. Apesar de nos questionarmos se a lesão hepática estaria associada as alterações vasculares, dados preliminares do nosso grupo com cultura celular sugerem que o DTG induz diretamente uma redução na expressão da eNOS (dados ainda não publicados).

Na presença de estresse oxidativo, os níveis de superóxido aumentam significativamente, o NO reage com o $O_2^{\cdot-}$, em uma reação limitada à difusão de NO e aproximadamente seis vezes mais rápida que a dismutação de $O_2^{\cdot-}$ pela SOD (Beckman & Koppenol, 1996), esta reação produz um oxidante potente, o peroxinitrito ($ONOO^-$). Esse fato poderia explicar nosso resultado de diminuição na produção de NO sem observar uma diferença na produção de superóxido nas aortas, devido a que o $O_2^{\cdot-}$ poderia já ter reagido com óxido nítrico formando peroxinitrito rapidamente.

Uma vez formado, o peroxinitrito pode modificar quimicamente aminoácidos, ácidos nucleicos e proteínas e peptídeos contendo tiol. O peroxinitrito é um dos responsáveis pela modificação oxidativa de proteínas formando a nitrotirosina (sendo esta, portanto, um marcador indireto do peroxinitrito). Níveis elevados de nitrotirosina são comumente encontrados em muitas condições patológicas onde há excesso na produção de NO e/ou radicais superóxido.

Muitos estudos demonstram que a nitração de proteínas é evidenciada em diferentes estágios da aterosclerose e a nitrotirosina aumentada também é observada no remodelamento vascular com formação de neointima (Mu *et al.*, 2008). Em nosso trabalho houve aumento de nitrotirosina nas aortas dos animais do grupo DTG, sugerindo aumento da oxidação proteica mediada por peroxinitrito. Assim, vale ressaltar que este efeito evidencia um maior estresse oxidativo ocasionado pelo DTG e provavelmente é o responsável pela menor atividade de eNOS e nNOS e menor biodisponibilidade de NO induzindo, portanto, prejuízo no relaxamento vascular.

No entanto, os resultados relatados aqui não sugerem um possível benefício dos antioxidantes como terapia adjuvante para prevenir a disfunção endotelial induzida por tratamentos com DTG e mais estudos são necessários para investigar a possibilidade de mecanismos adicionais de toxicidade.

Nosso próximo passo foi avaliar o efeito do DTG sobre a pressão arterial sistólica. Não foi encontrada diferença entre os grupos. Este resultado foi esperado tendo em vista que o impacto da disfunção endotelial gerada pelo DTG não é suficiente para alterar a resposta contrátil como observado nos experimentos de reatividade vascular. Ainda há controvérsia se a exposição a medicamentos antirretrovirais (ARV) representa um risco adicional para o desenvolvimento de hipertensão. Enquanto alguns estudos relataram um risco aumentado de hipertensão naqueles expostos a ARV em geral (Nduka *et al.*, 2016), outros não observaram essa associação (Hatileberg *et al.*, 2018).

Na avaliação da histopatologia cardíaca não observamos alterações associadas ao tratamento com Dolutegravir. No entanto na avaliação eletrocardiográfica no grupo tratado foram encontrados eletrocardiogramas sem alterações e animais com traçados eletrocardiográficos com achados como: PR prolongado indicando bloqueio do nó AV de primeiro grau, complexo QRS indicando possível distúrbio de condução intraventricular / bloqueio de ramo, sendo necessária realização de novos estudos eletrofisiológicos para

confirmação de resultado. Como em qualquer estudo, nossos achados devem ser interpretados com cautela e no contexto dos benefícios que o DTG proporciona.

Os pacientes infectados pelo HIV tomam uma associação de medicamentos para controlar a carga viral e isso dificulta a identificação dos efeitos colaterais causados por medicamentos individuais. A principal desvantagem dos estudos sobre os efeitos adversos dos medicamentos antirretrovirais é que eles podem envolver variações de paciente para paciente, tornando mais difícil a escolha da terapia certa para cada indivíduo.

Todos os pacientes infectados pelo HIV candidatos à terapia antirretroviral e os pacientes já em tratamento devem ser submetidos a uma avaliação que inclua análise do risco cardiovascular com as diretrizes atualmente disponíveis.

São necessários novos estudos para descobrir o mecanismo de toxicidade dos novos medicamentos antirretrovirais. Isso ajudará a se estruturar a combinação mais adequada de medicamentos a serem administrados, bem como a se produzir novos medicamentos ou modificar os medicamentos existentes para manter a eficácia antiviral sem interferir nas funções endotelial e hepática. E também é necessário ampliar a pesquisa de suplementos alimentares como antioxidantes, que podem ajudar a reduzir, algumas das complicações decorrentes de tratamentos medicamentosos.

7. CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho permitem concluir que o tratamento de longo prazo com DTG induziu disfunção endotelial, mediada pela diminuição da biodisponibilidade de NO, da expressão de eNOS e nNOS, sem alteração da resposta contrátil e também induziu esteatose e aumento do estresse oxidativo hepático, mas não alterou o perfil lipídico, glicemia, histologia cardíaca nem a pressão arterial em camundongos C57BL/6J.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abebe, M., Kinde, S., Belay, G., Gebreegziabxier, A., Challa, F., Gebeyehu, T., . . . Tegbaru, B. (2014). Antiretroviral treatment associated hyperglycemia and dyslipidemia among HIV infected patients at Burayu Health Center, Addis Ababa, Ethiopia: a cross-sectional comparative study. *BMC research notes*, 7(1), 380.
- Aebi, H. (1984). [13] Catalase in vitro *Methods in enzymology* (Vol. 105, pp. 121-126): Elsevier.
- Alipour, A., Elte, J., Van Zaanen, H., Rietveld, A. P., & Cabezas, M. C. (2008). Novel aspects of postprandial lipemia in relation to atherosclerosis. *Atherosclerosis Supplements*, 9(2), 39-44.
- Anson, B. D., Weaver, J. G., Ackerman, M. J., Akinsete, O., Henry, K., January, C. T., & Badley, A. D. (2005). Blockade of HERG channels by HIV protease inhibitors. *The Lancet*, 365(9460), 682-686.
- Anuurad, E., Thomas-Geevarghese, A., Devaraj, S., Albu, J., Minolfo, R., El-Sadr, W. M., . . . Berglund, L. (2008). Increased lipoprotein remnant cholesterol levels in HIV-positive patients during antiretroviral therapy. *Atherosclerosis*, 198(1), 192-197.
- Avunduk, M. C., Yurdakul, T., Erdemli, E., & Yavuz, A. (2003). Prevention of renal damage by alpha tocopherol in ischemia and reperfusion models of rats. *Urological research*, 31(4), 280-285.
- Bastard, J.-P., Caron, M., Vidal, H., Jan, V., Auclair, M., Vigouroux, C., . . . Girard, P.-M. (2002). Association between altered expression of adipogenic factor SREBP1 in lipotrophic adipose tissue from HIV-1-infected patients and abnormal adipocyte differentiation and insulin resistance. *The Lancet*, 359(9311), 1026-1031.
- Bavinger, C., Bendavid, E., Niehaus, K., Olshen, R. A., Olkin, I., Sundaram, V., . . . Owens, D. K. (2013). Risk of cardiovascular disease from antiretroviral therapy for HIV: a systematic review. *PLoS One*, 8(3).
- Beckman, J. S., & Koppenol, W. H. (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 271(5), C1424-C1437.
- Bernal, Q. F. (2016). Farmacología de los antirretrovirales. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 27(5), 682-697.
- Bhatia, L. S., Curzen, N. P., Calder, P. C., & Byrne, C. D. (2012). Non-alcoholic fatty liver disease: a new and important cardiovascular risk factor? *European heart journal*, 33(10), 1190-1200.
- Boccaro, F., Lang, S., Meuleman, C., Ederhy, S., Mary-Krause, M., Costagliola, D., . . . Cohen, A. (2013). HIV and coronary heart disease: time for a better understanding. *Journal of the American College of Cardiology*, 61(5), 511-523.
- Brehm, T. T., Franz, M., Hüfner, A., Hertling, S., Schmiedel, S., Degen, O., . . . zur Wiesch, J. S. (2019). Safety and efficacy of elvitegravir, dolutegravir, and raltegravir in a real-world cohort of treatment-naïve and-experienced patients. *Medicine*, 98(32).
- Brinkman, K., Smeitink, J. A., Romijn, J. A., & Reiss, P. (1999). Mitochondrial toxicity induced by nucleoside-analogue reverse-transcriptase inhibitors is a key factor in the pathogenesis of antiretroviral-therapy-related lipodystrophy. *The Lancet*, 354(9184), 1112-1115.

- Buzzetti, E., Pinzani, M., & Tsochatzis, E. A. (2016). The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism*, *65*(8), 1038-1048.
- Calza, L., Colangeli, V., Manfredi, R., Bon, I., Re, M. C., & Viale, P. (2016). Clinical management of dyslipidaemia associated with combination antiretroviral therapy in HIV-infected patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *71*(6), 1451-1465.
- Capettini, L., Cortes, S. F., Gomes, M. A., Silva, G., Pesquero, J. L., Lopes, M. J., . . . Lemos, V. S. (2008). Neuronal nitric oxide synthase-derived hydrogen peroxide is a major endothelium-dependent relaxing factor. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, *295*(6), H2503-H2511.
- Capettini, L. S., Cortes, S. F., & Lemos, V. S. (2010). Relative contribution of eNOS and nNOS to endothelium-dependent vasodilation in the mouse aorta. *European journal of pharmacology*, *643*(2-3), 260-266.
- Carlsson, G. (2019). UNAIDS Data 2019 (pp. 476): UNAIDS.
- Caron, M., Auclair, M., Vissian, A., Vigouroux, C., & Capeau, J. (2008). Contribution of mitochondrial dysfunction and oxidative stress to cellular premature senescence induced by antiretroviral thymidine analogues. *Antiviral therapy*, *13*(1), 27.
- Carr, A., & Cooper, D. A. (2000). Adverse effects of antiretroviral therapy. *The Lancet*, *356*(9239), 1423-1430.
- Cihlar, T., & Fordyce, M. (2016). Current status and prospects of HIV treatment. *Current opinion in virology*, *18*, 50-56.
- Conklin, B. S., Fu, W., Lin, P. H., Lumsden, A. B., Yao, Q., & Chen, C. (2004). HIV protease inhibitor ritonavir decreases endothelium-dependent vasorelaxation and increases superoxide in porcine arteries. *Cardiovascular research*, *63*(1), 168-175.
- Crum-Cianflone, N., Krause, D., Wessman, D., Medina, S., Stepenosky, J., Brandt, C., & Boswell, G. (2011). Fatty liver disease is associated with underlying cardiovascular disease in HIV-infected persons. *HIV medicine*, *12*(8), 463-471.
- Chai, H., Yang, H., Yan, S., Li, M., Lin, P. H., Lumsden, A. B., . . . Chen, C. (2005). Effects of 5 HIV protease inhibitors on vasomotor function and superoxide anion production in porcine coronary arteries. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, *40*(1), 12-19.
- Chatterjee, A., & Catravas, J. D. (2008). Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation. *Vascular pharmacology*, *49*(4-6), 134-140.
- Chromy, D., Mandorfer, M., Bucsics, T., Schwabl, P., Bauer, D., Scheiner, B., . . . Ferenci, P. (2019). Prevalence and Predictors of Hepatic Steatosis in Patients with HIV/HCV Coinfection and the Impact of HCV Eradication. *AIDS patient care and STDs*, *33*(5), 197-206.
- Dave, J. A., Levitt, N. S., Ross, I. L., Lacerda, M., Maartens, G., & Blom, D. (2016). Anti-retroviral therapy increases the prevalence of dyslipidemia in South African HIV-infected patients. *PLoS One*, *11*(3).
- Dekkers, C. C., Westerink, J., Hoepelman, A. I., & Arends, J. E. (2018). Overcoming obstacles in lipid-lowering therapy in patients with HIV—a systematic review of current evidence. *AIDS Rev*, *20*(4), 205-219.
- Dieterich, S., Bielick, U., Beulich, K., Hasenfuss, G., & Prestle, J. (2000). Gene expression of antioxidative enzymes in the human heart: increased expression of catalase in the end-stage failing heart. *Circulation*, *101*(1), 33-39.

- Dimala, C. A., & Blencowe, H. (2017). Association between highly active antiretroviral therapy and selected cardiovascular disease risk factors in sub-Saharan Africa: a systematic review and meta-analysis protocol. *BMJ open*, *7*(3), e013353.
- Esté, J. A., & Cihlar, T. (2010). Current status and challenges of antiretroviral research and therapy. *Antiviral research*, *85*(1), 25-33.
- Faltz, M., Bergin, H., Pilavachi, E., Grimwade, G., & Mabley, J. G. (2017). Effect of the anti-retroviral drugs efavirenz, tenofovir and emtricitabine on endothelial cell function: role of PARP. *Cardiovascular toxicology*, *17*(4), 393-404.
- Fantoni, M., Autore, C., & Del Borgo, C. (2001). Drugs and cardiotoxicity in HIV and AIDS. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *946*(1), 179-199.
- Farrell, G. C., & Larter, C. Z. (2006). Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology*, *43*(S1), S99-S112.
- Feinstein, M. J., Hsue, P. Y., Benjamin, L. A., Bloomfield, G. S., Currier, J. S., Freiberg, M. S., . . . Post, W. S. (2019). Characteristics, prevention, and management of cardiovascular disease in people living with HIV: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*, *140*(2), e98-e124.
- Flint, O. P., Noor, M. A., Hruz, P. W., Hylemon, P. B., Yarasheski, K., Kotler, D. P., . . . Bellamine, A. (2009). The role of protease inhibitors in the pathogenesis of HIV-associated lipodystrophy: cellular mechanisms and clinical implications. *Toxicologic pathology*, *37*(1), 65-77.
- Folch, J., Lees, M., & Stanley, G. S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, *226*(1), 497-509.
- Fong, P. S., Flynn, D. M., Evans, C. D., & Korthuis, P. T. (2017). Integrase strand transfer inhibitor-associated diabetes mellitus: A case report. *International journal of STD & AIDS*, *28*(6), 626-628.
- Förstermann, U., & Sessa, W. C. (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *European heart journal*, *33*(7), 829-837.
- Francque, S. M., van der Graaff, D., & Kwanten, W. J. (2016). Non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk: Pathophysiological mechanisms and implications. *Journal of hepatology*, *65*(2), 425-443.
- Fukai, T., & Ushio-Fukai, M. (2011). Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxidants & redox signaling*, *15*(6), 1583-1606.
- Ganta, K. K., & Chaubey, B. (2019). Mitochondrial dysfunctions in HIV infection and antiviral drug treatment. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, *15*(12), 1043-1052.
- Gaschler, M. M., & Stockwell, B. R. (2017). Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and biophysical research communications*, *482*(3), 419-425.
- Giannini, E. G., Testa, R., & Savarino, V. (2005). Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *Cmaj*, *172*(3), 367-379.
- Gili, S., Mancone, M., Ballocca, F., Grosso Marra, W., Calcagno, A., D'Ettore, G., . . . Marruncheddu, L. (2017). Prevalence and predictors of long corrected QT interval in HIV-positive patients: a multicenter study. *Journal of Cardiovascular Medicine*, *18*(7), 539-544.
- Gliozzi, M., Scicchitano, M., Bosco, F., Musolino, V., Carresi, C., Scarano, F., . . . Paone, S. (2019). Modulation of nitric oxide synthases by oxidized LDLs: role in vascular inflammation and atherosclerosis development. *International journal of molecular sciences*, *20*(13), 3294.

- Glover, M., Hebert, V. Y., Nichols, K., Xue, S. Y., Thibeaux, T. M., Zavec, J. A., & Dugas, T. R. (2014). Overexpression of mitochondrial antioxidant manganese superoxide dismutase (MnSOD) provides protection against AZT-or 3TC-induced endothelial dysfunction. *Antiviral research*, *111*, 136-142.
- Gonçalves, J. L., Lacerda-Queiroz, N., Sabino, J. F., Marques, P. E., Galvão, I., Gamba, C. O., . . . Versiani, A. (2017). Evaluating the effects of refined carbohydrate and fat diets with acute ethanol consumption using a mouse model of alcoholic liver injury. *The Journal of nutritional biochemistry*, *39*, 93-100.
- Guaraldi, G., Orlando, G., Zona, S., Menozzi, M., Carli, F., Garlassi, E., . . . Palella, F. (2011). Premature age-related comorbidities among HIV-infected persons compared with the general population. *Clinical infectious diseases*, *53*(11), 1120-1126.
- Gupta, S. K., Shen, C., Moe, S. M., Kamendulis, L. M., Goldman, M., & Dubé, M. P. (2012). Worsening endothelial function with efavirenz compared to protease inhibitors: a 12-month prospective study. *PLoS One*, *7*(9).
- Han, S.-n., Sun, X.-y., Zhang, Z., & Zhang, L.-r. (2015). The protease inhibitor atazanavir blocks hERG K⁺ channels expressed in HEK293 cells and obstructs hERG protein transport to cell membrane. *Acta Pharmacologica Sinica*, *36*(4), 454-462.
- Hatleberg, C. I., Ryom, L., d'Arminio Monforte, A., Fontas, E., Reiss, P., Kirk, O., . . . Dabis, F. (2018). Association between exposure to antiretroviral drugs and the incidence of hypertension in HIV-positive persons: the Data Collection on Adverse Events of Anti-HIV Drugs (D: A: D) study. *HIV medicine*, *19*(9), 605-618.
- Henry, K., Melroe, H., Huebsch, J., Hermundson, J., Levine, C., Swensen, L., & Daley, J. (1998). Severe premature coronary artery disease with protease inhibitors. *The Lancet*, *351*(9112), 1328.
- Honnapurmath, V. K., & Patil, V. (2017). Antiretroviral therapy-induced insulin resistance and oxidative deoxy nucleic acid damage in human immunodeficiency virus-1 patients. *Indian journal of endocrinology and metabolism*, *21*(2), 316.
- Ioannou, G. N., Weiss, N. S., Boyko, E. J., Mozaffarian, D., & Lee, S. P. (2006). Elevated serum alanine aminotransferase activity and calculated risk of coronary heart disease in the United States. *Hepatology*, *43*(5), 1145-1151.
- Jacome-Sosa, M. M., & Parks, E. J. (2014). Fatty acid sources and their fluxes as they contribute to plasma triglyceride concentrations and fatty liver in humans. *Current opinion in lipidology*, *25*(3), 213-220.
- Jiang, B., Hebert, V. Y., Li, Y., Mathis, J. M., Alexander, J. S., & Dugas, T. R. (2007). HIV antiretroviral drug combination induces endothelial mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species production, but not apoptosis. *Toxicology and applied pharmacology*, *224*(1), 60-71.
- Kakuda, T. N., Brundage, R. C., Anderson, P. L., & Fletcher, C. V. (1999). Nucleoside reverse transcriptase inhibitor-induced mitochondrial toxicity as an etiology for lipodystrophy. *Aids*, *13*(16), 2311.
- Kerchberger, A. M., Sheth, A. N., Angert, C. D., Mehta, C. C., Summers, N. A., Ofotokun, I., . . . Adimora, A. A. (2019). Weight gain associated with integrase stand transfer inhibitor use in women. *Clinical infectious diseases*.
- Kline, E. R., & Sutliff, R. L. (2008). The roles of HIV-1 proteins and antiretroviral drug therapy in HIV-1-associated endothelial dysfunction. *Journal of Investigative Medicine*, *56*(5), 752-769.

- Lagathu, C., Béréziat, V., Gorwood, J., Fellahi, S., Bastard, J.-P., Vigouroux, C., . . . Capeau, J. (2019). Metabolic complications affecting adipose tissue, lipid and glucose metabolism associated with HIV antiretroviral treatment. *Expert opinion on drug safety*, 18(9), 829-840.
- Lagathu, C., Eustace, B., Prot, M., Frantz, D., Gu, Y., Bastard, J.-P., . . . Caron, M. (2007). Some HIV antiretrovirals increase oxidative stress and alter chemokine, cytokine or adiponectin production in human adipocytes and macrophages. *Antiviral therapy*, 12(4), 489.
- Law, M., Friis-Møller, N., Weber, R., Reiss, P., Thiebaut, R., Kirk, O., . . . Calvo, G. (2003). Modelling the 3-year risk of myocardial infarction among participants in the Data Collection on Adverse Events of Anti-HIV Drugs (DAD) study. *HIV medicine*, 4(1), 1-10.
- Lee, G. A., Rao, M., Mulligan, K., Lo, J. C., Aweeka, F., Schwarz, J.-M., . . . Grunfeld, C. (2007). Effects of ritonavir and amprenavir on insulin sensitivity in healthy volunteers. *AIDS (London, England)*, 21(16), 2183.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Madamanchi, N. R., Vendrov, A., & Runge, M. S. (2005). Oxidative stress and vascular disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 25(1), 29-38.
- Marincowitz, C., Genis, A., Goswami, N., De Boever, P., Nawrot, T. S., & Strijdom, H. (2019). Vascular endothelial dysfunction in the wake of HIV and ART. *The FEBS journal*, 286(7), 1256-1270.
- May, M. T., Gompels, M., Delpech, V., Porter, K., Orkin, C., Kegg, S., . . . Gilson, R. (2014). Impact on life expectancy of HIV-1 positive individuals of CD4+ cell count and viral load response to antiretroviral therapy. *AIDS (London, England)*, 28(8), 1193.
- Mellinger, J. L., Pencina, K. M., Massaro, J. M., Hoffmann, U., Seshadri, S., Fox, C. S., O'Donnell, C. J., & Speliotes, E. K. (2015). Hepatic steatosis and cardiovascular disease outcomes: An analysis of the Framingham Heart Study. *Journal of hepatology*, 63(2), 470-476.
- McCord, J. M. (2000). The evolution of free radicals and oxidative stress. *The American journal of medicine*, 108(8), 652-659.
- McLaughlin, M., Walsh, S., & Galvin, S. (2018). Dolutegravir-induced hyperglycaemia in a patient living with HIV. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(1), 258-260.
- Moure, R., Domingo, P., Gallego-Escuredo, J. M., Villarroya, J., del Mar Gutierrez, M., Mateo, M. G., . . . Villarroya, F. (2016). Impact of elvitegravir on human adipocytes: alterations in differentiation, gene expression and release of adipokines and cytokines. *Antiviral research*, 132, 59-65.
- Mu, H., Wang, X., Lin, P., Yao, Q., & Chen, C. (2008). Nitrotyrosine promotes human aortic smooth muscle cell migration through oxidative stress and ERK1/2 activation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1783(9), 1576-1584.
- Nduka, C., Sarki, A., Uthman, O., & Stranges, S. (2015). Impact of antiretroviral therapy on serum lipoprotein levels and dyslipidemias: a systematic review and meta-analysis. *International journal of cardiology*, 199, 307-318.
- Nduka, C., Stranges, S., Sarki, A., Kimani, P., & Uthman, O. (2016). Evidence of increased blood pressure and hypertension risk among people living with HIV

- on antiretroviral therapy: a systematic review with meta-analysis. *Journal of Human Hypertension*, 30(6), 355-362.
- Nguyen, B. Y. T., Isaacs, R. D., Teppler, H., Leavitt, R. Y., Sklar, P., Iwamoto, M., . . . Kemp, R. (2011). Raltegravir: the first HIV-1 integrase strand transfer inhibitor in the HIV armamentarium. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1222(1), 83-89.
- Ofotokun, I., Na, L. H., Landovitz, R. J., Ribaldo, H. J., McComsey, G. A., Godfrey, C., . . . Kuritzkes, D. R. (2015). Comparison of the metabolic effects of ritonavir-boosted darunavir or atazanavir versus raltegravir, and the impact of ritonavir plasma exposure: ACTG 5257. *Clinical infectious diseases*, 60(12), 1842-1851.
- Ogunmola, O. J., Oladosu, Y. O., & Olamoyegun, M. A. (2015). QTCinterval prolongation in HIV-negative versus HIV-positive subjects with or without antiretroviral drugs. *Annals of African medicine*, 14(4), 169.
- Pau, A. K., & George, J. M. (2014). Antiretroviral therapy: current drugs. *Infectious Disease Clinics*, 28(3), 371-402.
- Peñafiel, J., de Lazzari, E., Padilla, M., Rojas, J., Gonzalez-Cordon, A., Blanco, J. L., . . . Martinez-Rebollar, M. (2017). Tolerability of integrase inhibitors in a real-life setting. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(6), 1752-1759.
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian journal of clinical biochemistry*, 30(1), 11-26.
- Pommier, Y., Johnson, A. A., & Marchand, C. (2005). Integrase inhibitors to treat HIV/AIDS. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(3), 236-248.
- Quercia, R., Roberts, J., Martin-Carpenter, L., & Zala, C. (2015). Comparative changes of lipid levels in treatment-naive, HIV-1-infected adults treated with dolutegravir vs. efavirenz, raltegravir, and ritonavir-boosted darunavir-based regimens over 48 weeks. *Clinical drug investigation*, 35(3), 211-219.
- Rathbun, R. C., Lockhart, S. M., Miller, M. M., & Liedtke, M. D. (2014). Dolutegravir, a second-generation integrase inhibitor for the treatment of HIV-1 infection. *Annals of Pharmacotherapy*, 48(3), 395-403.
- Reagan-Shaw, S., Nihal, M., & Ahmad, N. (2008). Dose translation from animal to human studies revisited. *The FASEB journal*, 22(3), 659-661.
- Riddle, T. M., Kuhel, D. G., Woollett, L. A., Fichtenbaum, C. J., & Hui, D. Y. (2001). HIV protease inhibitor induces fatty acid and sterol biosynthesis in liver and adipose tissues due to the accumulation of activated sterol regulatory element-binding proteins in the nucleus. *Journal of Biological Chemistry*, 276(40), 37514-37519.
- Riddle, T. M., Schildmeyer, N. M., Phan, C., Fichtenbaum, C. J., & Hui, D. Y. (2002). The HIV protease inhibitor ritonavir increases lipoprotein production and has no effect on lipoprotein clearance in mice. *Journal of lipid research*, 43(9), 1458-1463.
- Sani, M. U., & Okeahialam, B. N. (2005). QTc interval prolongation in patients with HIV and AIDS. *Journal of the National Medical Association*, 97(12), 1657.
- Schindhelm, R. K., Dekker, J. M., Nijpels, G., Bouter, L. M., Stehouwer, C. D., Heine, R. J., & Diamant, M. (2007). Alanine aminotransferase predicts coronary heart disease events: a 10-year follow-up of the Hoorn Study. *Atherosclerosis*, 191(2), 391-396.

- Sension, M., & Deckx, H. (2015). Lipid metabolism and lipodystrophy in HIV-1-infected patients: the role played by nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors. *AIDS reviews*, *17*(1), 21-36.
- Shah, A. S., Stelzle, D., Lee, K. K., Beck, E. J., Alam, S., Clifford, S., . . . Whiteley, W. (2018). Global burden of atherosclerotic cardiovascular disease in people living with HIV: systematic review and meta-analysis. *Circulation*, *138*(11), 1100-1112.
- Soriano, F. G., Pacher, P., Mabley, J., Liaudet, L., & Szabó, C. (2001). Rapid reversal of the diabetic endothelial dysfunction by pharmacological inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase. *Circulation research*, *89*(8), 684-691.
- Szabados, E., Fischer, G., Toth, K., Csete, B., Nemeti, B., Trombitas, K., . . . Sumegi, B. (1999). Role of reactive oxygen species and poly-ADP-ribose polymerase in the development of AZT-induced cardiomyopathy in rat. *Free Radical Biology and Medicine*, *26*(3-4), 309-317.
- Tadesse, B. T., Foster, B. A., Chala, A., Chaka, T. E., Bizuayehu, T., Ayalew, F., . . . Aklillu, E. (2019). HIV and cART-Associated Dyslipidemia Among HIV-Infected Children. *Journal of clinical medicine*, *8*(4), 430.
- Triant, V. A., Lee, H., Hadigan, C., & Grinspoon, S. K. (2007). Increased acute myocardial infarction rates and cardiovascular risk factors among patients with human immunodeficiency virus disease. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *92*(7), 2506-2512.
- van Lunzen, J., Maggiolo, F., Arribas, J. R., Rakhmanova, A., Yeni, P., Young, B., . . . Brothers, C. (2012). Once daily dolutegravir (S/GSK1349572) in combination therapy in antiretroviral-naive adults with HIV: planned interim 48 week results from SPRING-1, a dose-ranging, randomised, phase 2b trial. *The Lancet infectious diseases*, *12*(2), 111-118.
- van Welzen, B. J., Mudrikova, T., El Idrissi, A., Hoepelman, A. I., & Arends, J. E. (2019). A review of non-alcoholic fatty liver disease in HIV-infected patients: the next big thing? *Infectious diseases and therapy*, *8*(1), 33-50.
- Van Wijk, J. P., & Cabezas, M. C. (2012). Hypertriglyceridemia, metabolic syndrome, and cardiovascular disease in HIV-infected patients: effects of antiretroviral therapy and adipose tissue distribution. *International journal of vascular medicine*, *2012*.
- Vella, S., Schwartländer, B., Sow, S. P., Eholie, S. P., & Murphy, R. L. (2012). The history of antiretroviral therapy and of its implementation in resource-limited areas of the world. *Aids*, *26*(10), 1231-1241.
- Venhoff, N., Setzer, B., Melkaoui, K., & Walker, U. A. (2007). Mitochondrial toxicity of tenofovir, emtricitabine and abacavir alone and in combination with additional nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Antiviral therapy*, *12*(7), 1075.
- Vittecoq, D., Escaut, L., & Monsuez, J. (1998). Vascular complications associated with use of HIV protease inhibitors. *The Lancet*, *351*(9120), 1959.
- Wainberg, M. A. (2012). The need for development of new HIV-1 reverse transcriptase and integrase inhibitors in the aftermath of antiviral drug resistance. *Scientifica*, *2012*.
- Wallin, B., Rosengren, B., Shertzer, H. G., & Camejo, G. (1993). Lipoprotein oxidation and measurement of thiobarbituric acid reacting substances formation in a single microtiter plate: its use for evaluation of antioxidants. *Analytical Biochemistry*, *208*(1), 10-15.

- Wang, X., Chai, H., Lin, P. H., Yao, Q., & Chen, C. (2009). Roles and mechanisms of human immunodeficiency virus protease inhibitor ritonavir and other anti-human immunodeficiency virus drugs in endothelial dysfunction of porcine pulmonary arteries and human pulmonary artery endothelial cells. *The American journal of pathology*, *174*(3), 771-781.
- Wang, Y., Seitz, H. K., & Wang, X. D. (2010). Moderate alcohol consumption aggravates high-fat diet induced steatohepatitis in rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, *34*(3), 567-573.
- Weiß, M., Kost, B., Renner-Müller, I., Wolf, E., Mylonas, I., & Brüning, A. (2016). Efavirenz causes oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and autophagy in endothelial cells. *Cardiovascular toxicology*, *16*(1), 90-99.
- X Cubeddu, L. (2016). Drug-induced inhibition and trafficking disruption of ion channels: pathogenesis of QT abnormalities and drug-induced fatal arrhythmias. *Current cardiology reviews*, *12*(2), 141-154.
- Xia, B., Cai, G. H., Yang, H., Wang, S. P., Mitchell, G. A., & Wu, J. W. (2017). Adipose tissue deficiency of hormone-sensitive lipase causes fatty liver in mice. *PLoS genetics*, *13*(12), e1007110.
- Yadav, G., Kumar, P., Kumar, Y., & Singh, P. K. (2018). Dolutegravir, Second Generation Integrase Inhibitor: A New Hope for HIV Patient. *European Journal of Molecular & Clinical Medicine*, *5*(1).
- Younossi, Z. M., Golabi, P., de Avila, L., Paik, J. M., Srishord, M., Fukui, N., . . . Nader, F. (2019). The global epidemiology of NAFLD and NASH in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Journal of hepatology*, *71*(4), 793-801.
- Younossi, Z. M., Koenig, A. B., Abdelatif, D., Fazel, Y., Henry, L., & Wymer, M. (2016). Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*, *64*(1), 73-84.
- Yun, K. E., Shin, C. Y., Yoon, Y. S., & Park, H. S. (2009). Elevated alanine aminotransferase levels predict mortality from cardiovascular disease and diabetes in Koreans. *Atherosclerosis*, *205*(2), 533-537.
- Zhou, S., Chan, S. Y., Goh, B. C., Chan, E., Duan, W., Huang, M., & McLeod, H. L. (2005). Mechanism-based inhibition of cytochrome P450 3A4 by therapeutic drugs. *Clinical pharmacokinetics*, *44*(3), 279-304.

Anexo - Parecer do Comitê de Ética em experimentação animal

	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
UFMG	
Prezado(a):	
Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.	
Protocolo CEUA: 394/2018	
Título do projeto: Avaliação dos efeitos cardiometabólicos do inibidor de integrase dolutegravir em camundongos	
Finalidade: Pesquisa	
Pesquisador responsável: Luciano dos Santos Aggum Capettini	
Unidade: Instituto de Ciências Biológicas	
Departamento: Departamento de Farmacologia	
Situação atual: Decisão Final - Aprovado	
Aprovado na reunião do dia 29/04/2019. Validade: 29/04/2019 à 28/04/2024	
Belo Horizonte, 29/04/2019.	
Atenciosamente,	
Sistema Solicite CEUA UFMG	
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/	
Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3409-4516 www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpg.ufmg.br	