



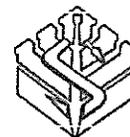
UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
MAESTRÍA EN TOXICOLOGÍA ANALÍTICA



**TOXICIDAD HEPÁTICA INDUCIDA POR LA ASOCIACIÓN DE
EMTRICITABINA Y TENOFOVIR: MODELO EXPERIMENTAL EN
RATAS**

Autor: Lcda. Iraida C Graterol Q
Tutora: Prof. Yalitza Aular

Valencia, Octubre 2020



ACTA DE DISCUSIÓN DE TRABAJO DE GRADO

En atención a lo dispuesto en los Artículos 137, 138 y 139 del Reglamento de Estudios de Postgrado de la Universidad de Carabobo, quienes suscribimos como Jurado designado por el Consejo de Postgrado de la Facultad de Ciencias de la Salud, de acuerdo a lo previsto en el Artículo 135 del citado Reglamento, para estudiar el Trabajo de Grado titulado:

TOXICIDAD HEPÁTICA INDUCIDA POR LA ASOCIACIÓN DE EMTRICITABINA Y TENOFOVIR: MODELO EXPERIMENTAL EN RATAS

Presentado para optar al grado de **Magíster en Toxicología Analítica**, por el (la) aspirante:

GRATEROL Q., IRAIDA C
C.I. V- 17398320

Habiendo examinado el Trabajo presentado, bajo la tutoría del profesor(a): Yalitza Aular C.I. 4310690, decidimos que el mismo está **APROBADO** .

Acta que se expide en valencia, en fecha: **08/12/2020**

Prof. Yalitza Aular (Pdte)

C.I. 4.310.690

Fecha: 08-12-2020

Prof. Yelitza Castillo

C.I.

Fecha:

TG:

7.128763
08/12/2020

Prof. Tibisay Matheus

C.I. 10.106.854

Fecha: 08/12/2020

TG-CS:

ACTA DE CONSTITUCIÓN DE JURADO Y DE APROBACIÓN DEL TRABAJO

Quienes suscriben esta Acta, Jurados de la Tesis de Grado titulada:

"TOXICIDAD HEPÁTICA INDUCIDA POR LA ASOCIACIÓN DE EMTRICITABINA Y TENOFOVIR: MODELO EXPERIMENTAL EN RATAS"

Presentado por el (la) ciudadano (a): **GRATEROL Q., IRAIDA C** titular de la cédula de identidad **Nº V-17398320**, Nos damos como constituidos durante el día de hoy: 01-12-2020 y convenimos en citar al alumno para la discusión de su Trabajo el día: 08-12-2020.

RESOLUCIÓN

Aprobado: X Fecha: 01-12-2020 *Reprobado: _____ Fecha: _____.

Observación: _____



Presidente del Jurado

Nombre: Yalitza Aular

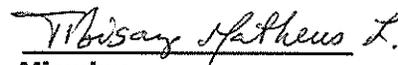
C.I. 4.310.690



Miembro

Nombre: Yelitza Castro

C.I. 7122767



Miembro

Nombre: TIBILAY MATHEWS

C.I. 10.106.854

Nota:

1. Esta Acta debe ser consignada en la Dirección de Asuntos Estudiantiles de la Facultad de Ciencias de la Salud (Sede Carabobo), inmediatamente después de la constitución del Jurado y/o de tener un veredicto definitivo, debidamente firmada por los tres miembros, para agilizar los trámites correspondientes a la elaboración del Acta de Aprobación del Trabajo.
2. *En caso de que el Trabajo sea reprobado, se debe anexar un informe explicativo, firmado por los tres miembros del Jurado.

**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
MAESTRÍA EN TOXICOLOGÍA ANALÍTICA**

**TOXICIDAD HEPÁTICA INDUCIDA POR LA ASOCIACIÓN DE
EMTRICITABINA Y TENOFOVIR: MODELO EXPERIMENTAL EN
RATAS**

Autor: Lcda. Iraida C Graterol Q

Trabajo de grado presentado
ante la Dirección de Postgrado -
Facultad de Ciencias de
la Salud de la Universidad de
Carabobo para optar al título de
Magíster en Toxicología
Analítica.

Valencia, Octubre 2020

**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
MAESTRÍA EN TOXICOLOGÍA ANALÍTICA**

**CONSTANCIA DE
ACEPTACIÓN DEL TUTOR**

**TOXICIDAD HEPÁTICA INDUCIDA POR LA ASOCIACIÓN DE
EMTRICITABINA Y TENOFOVIR: MODELO EXPERIMENTAL EN
RATAS**

TUTORA: Prof. Yalitz Aular

Acepto la Tutoría del presente Trabajo según las condiciones de la Dirección de Postgrado - Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Carabobo.


C.I: 4.310.690

Valencia, Octubre 2020

**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
MAESTRIA EN TOXICOLOGÍA ANALÍTICA**

**CONSTANCIA DE
APROBACIÓN DEL PROFESOR DE SEMINARIO**

**TOXICIDAD HEPÁTICA INDUCIDA POR LA ASOCIACIÓN DE
EMTRICITABINA Y TENOFOVIR: MODELO EXPERIMENTAL EN
RATAS**

Aprobada en la Dirección de Postgrado por Yolima Fernández, Profesora del Seminario de Investigación y Trabajo de Grado.

PROFESORA: Yolima Fernández



C.I: 13.382.234

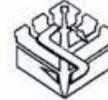
Valencia, Octubre 2020

Universidad de Carabobo



Valencia – Venezuela

Facultad de Ciencias de la Salud



Dirección de Postgrado

ACTA DE APROBACIÓN DEL PROYECTO TRABAJO DE GRADO

Los Miembros de la Comisión Coordinadora de la Maestría en: Toxicología Analítica hacen constar que han leído el Proyecto de Trabajo de Grado, presentado por la ciudadana: Iraida Graterol, cédula de identidad N° 17.398.320, para optar al título de Magíster en: Toxicología Analítica, cuyo título es: “Toxicidad hepática inducida por la asociación de emtricitabina y tenofovir: modelos experimental en ratas, y que el mismo está **APROBADO** ya que reúne los requisitos de factibilidad, originalidad e interés que plantea la línea de investigación: “Vigilancia Farmacológica”, establecida por esta Maestría. Igualmente, el mencionado Proyecto está enmarcado dentro de la normativa para la elaboración y presentación de los trabajos de grado para esta Maestría.

La profesora: Yalitza Aular, C.I. N° 4.310.690, aceptó la tutoría de éste Trabajo.

En Valencia, a los 07 días del mes de Marzo de Dos Mil Diez y seis.

Comisión Coordinadora:

Prof. J. Aular
Miembro de la Comisión



Prof. J. Aular
Coordinador(a)

Prof. J. Aular
Miembro de la Comisión

Formato aprobado por el Consejo de Postgrado en su Sesión Ordinaria N° 4 de fecha 30 de abril de 2013.

Iraida Graterol

UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
MAESTRÍA EN TOXICOLOGIA ANALÍTICA

VEREDICTO

Nosotros, miembros del jurado designado para la revisión y aprobación del trabajo de grado titulado TOXICIDAD HEPÁTICA INDUCIDA POR LA ASOCIACIÓN DE EMTRICITABINA Y TENOFOVIR: MODELO EXPERIMENTAL EN RATAS, presentado por la: Lcda. Iraida C. Graterol Q., para optar al título de Magíster en Toxicología Analítica. Estimamos que el mismo reúne los requisitos para ser considerado como: _____

Nombres y Apellidos, Cédula de Identidad y Firmas del Jurado.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por protegerme durante todo mi camino y darme la fuerza para superar cada obstáculo y dificultad a lo largo de toda mi vida.

A mi hija Emma Sofía, por ser mi mayor fuente de motivación.

A Mis Padres, por su amor infinito, por cada palabra de aliento, apoyo incondicional y llenar de amor y alegría cada día de Emma Sofía.

A la Profa. Yalitz Aular, por el tiempo y esfuerzo que dedicó para compartir su conocimiento y experiencia, la cual sirvió de guía, apoyo y motivación. Gracias a usted pude lograr mi meta.

A la Profa. Yolima Fernández, por todo su aporte académico, dedicación y apoyo incondicional desde el inicio de esta maestría.

A la Dra. Silvia Guidotti, por compartir su conocimiento sobre el manejo adecuado de los animales de experimentación usados en este trabajo de investigación.

Al Dr. Aldo Reigosa, por su valioso aporte durante el estudio histológico de esta investigación.

A la Profa. Merlin Villamizar, por su valiosa colaboración en la determinación de micronúcleos hepáticos

Al Tec. José Ostos, por su tiempo, colaboración y apoyo incondicional.

A todo el personal del Departamento de parasitología de la Universidad de Carabobo, por el buen trato que hicieron muy agradable mi estadía y trabajo en el Bioterio.

A todo el personal del CIMBUC, por su disposición y ayuda en todo momento durante la realización de la fase experimental de este trabajo de investigación.

A todas aquellas personas que me brindaron su ayuda para la lograr mi meta.

INDICE GENERAL

	PAG
Título	i
Portada	ii
Constancia de Aceptación del Tutor	iv
Constancia de Aprobación del Profesor De Seminario	v
Acta de Aprobación del proyecto	vi
Veredicto	vii
Agradecimiento	viii
Índice general	ix
Índice de gráficos	xi
Índice de tablas	xii
Índice de figuras	xiii
Resumen	xiv
Abstract	xv
Capítulo I: El Problema	1
Planteamiento del Problema	1
Objetivos:	8
- Objetivo General	8
- Objetivos Específicos	8
Justificación	10
Capítulo II: Marco Teórico	12
Antecedentes de la Investigación	12
Bases Teóricas	19
Sistema De Variables	33
- Variables Independientes	33
- Variables Dependiente	33
Formulación de Hipótesis	34
- Hipótesis Operacional	34
- Hipótesis Nula	34
Operacionalización de las Variables	35
Capítulo III: Metodología	36
Tipo de Investigación	36
Nivel o Modalidad de la Investigación	36
Muestra	36
Técnica de Recolección de la Información	39
- Consideraciones éticas	40
Recolección de las Muestra	41
Procesamiento de las Muestra	42
- Determinación de las Transaminasas	42

- Determinación de Bilirrubina Total y Fraccionada	44
- Determinación de Fosfatasa Alcalina	45
- Determinación de los valores de referencia	47
- Técnicas Histológicas	47
- Determinación de micronúcleos en hepatocitos	49
Análisis Estadístico	51
Capítulo IV: Resultados	52
Peso	52
Transaminasas	55
Bilirrubina	61
Fosfatasa Alcalina	67
Cambios histológicos	71
Micronúcleos en hepatocitos	76
Capítulo V: Discusión	81
Capítulo VI: Conclusión	87
Referencias Bibliográficas	88

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO No	TÍTULO	PAG
Gráfico 1	Promedio de peso del Grupo Agudo durante el período experimental.	53
Gráfico 2	Promedio de peso del Grupo Crónico durante el período experimental.	54
Gráfico 3	Valores de Aspartato Aminotransaminasa (AST) del Grupo Agudo durante el período experimental.	56
Gráfico 4	Valores de Aspartato Aminotransaminasa (AST) del Grupo Crónico durante el período experimental.	57
Gráfico 5	Valores de Alanino Aminotransaminasa (ALT) del Grupo Agudo durante el período experimental.	59
Gráfico 6	Valores de Alanino Aminotransaminasa (ALT) del Grupo Crónico durante el período experimental.	60
Gráfico 7	Valores de Bilirrubina total del Grupo Agudo durante el período experimental.	62
Gráfico 8	Valores de Bilirrubina total del Grupo Crónico durante el período experimental.	63
Gráfico 9	Valores de Bilirrubina directa del Grupo Agudo durante el período experimental.	65
Gráfico 10	Valores de Bilirrubina directa del Grupo Crónico durante el período experimental.	66
Gráfico 11	Valores de Fosfatasa alcalina del Grupo Agudo durante el período experimental.	69
Gráfico 12	Valores de Fosfatasa alcalina del Grupo Agudo durante el período experimental.	70

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA No	TÍTULO	PAG
Tabla 1	Alteraciones histológicas en hígado de ratas de los grupos experimentales.	72
Tabla 2	Presencia de Micronúcleos e Índice de Citotoxicidad del Grupo Agudo.	79
Tabla 3	Presencia de Micronúcleos e Índice de Citotoxicidad del Grupo Crónico.	80

INDICE DE FIGURAS

FIGURA No	TÍTULO	PAG
Figura 1	Hígado: HE X200	73
Figura 2	Hígado: TG X200	74
Figura 3	Hígado: TG X200	75
Figura 4	Hígado: Tinción de Giemsa X100	78



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
MAESTRÍA EN TOXICOLOGÍA ANALÍTICA



**TOXICIDAD HEPÁTICA INDUCIDA POR LA ASOCIACIÓN DE
EMTRICITABINA Y TENOFOVIR: MODELO EXPERIMENTAL EN
RATAS**

Autor: Iraida Graterol
Tutora: Prof. Yalitzá Aular
Año: 2020

RESUMEN

El Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) es un importante problema de salud pública, por desarrollar infecciones oportunistas y enfermedades neoplásicas en pacientes con inmunosupresión progresiva infectados por el Virus de Inmunodeficiencia Humana. Aunque no existe tratamiento curativo, el desarrollo de diversos tipos de antirretrovirales ha permitido convertir una enfermedad mortal a corto plazo, en una condición con expectativa de vida prolongada utilizando combinaciones de antirretrovirales denominándose tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA), lo que podría ocasionar toxicidad hepática inducida por fármacos. El objetivo general del estudio fue evaluar la toxicidad hepática inducida por la asociación de tenofovir y emtricitabina en un modelo experimental en 70 ratas albinas *Sprague Dawley*, adultas jóvenes, a las que se les administró, vía oral, tenofovir o tenofovir asociado a Emtricitabina, durante 28 días (grupo agudo) o 90 días (grupo crónico). Los parámetros evaluados fueron variaciones de peso, marcadores hepáticos, alteraciones histológicas y presencia de micronúcleos. Los resultados mostraron un aumento transitorio de los valores de AST en animales de ambos sexos en el grupo agudo tenofovir y tenofovir asociado a emtricitabina, aumento significativo ($p < 0,05$) de los valores de fosfatasa alcalina en los grupos machos y hembras tanto agudo como crónico y valores de bilirrubina con tendencia al aumento en el grupo crónico, aunque no fueron significativos, alteraciones histológicas (dilatación sinusoidal, fibrosis centrolobulillar, fibrosis parenquimatosa e infiltrado leucocitario) leves y moderados en muestras de hígado. Sin pérdida de peso significativa ni presencia de micronúcleos en eritrocitos policromatófilos. Concluyendo que, los cambios observados sugieren alteraciones hepáticas (leves-moderadas) y la necesidad de un estudio más amplio para evaluar una posible obstrucción en los conductos biliares hepáticos.

Palabras clave: antirretrovirales, Tenofovir, Emtricitabina, toxicidad hepática, micronúcleos.



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
MAESTRÍA EN TOXICOLOGÍA ANALÍTICA**



**HEPATIC TOXICITY INDUCED BY THE ASSOCIATION OF
EMTRICITABINE AND TENOFOVIR: EXPERIMENTAL MODEL IN RATS**

**Author: Iraida C Graterol Q
Tutor: Prof. Yalitza Aular
Year: 2020**

ABSTRACT

Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) has become in a major public concern, because of developing opportunistic infections and neoplastic diseases in patients with progressive immunosuppression infected by the Human Immunodeficiency Virus (HIV). Although there is no curative treatment, the development of several types of antiretrovirals has improved what used to be considered a deadly disease with a short lifespan for those afflicted by the aforementioned, into a condition with a prolonged life expectancy, by the combinations of antiretrovirals denominated high activity antiretroviral treatment (HAART), which could cause a drug-induced toxicity hepatic. The general objective of the study was to evaluate the hepatic toxicity induced by the association of tenofovir and emtricitabine in an experimental model in 70 Sprague Dawley young adults albino rats, who were administered orally, tenofovir or tenofovir associated to emtricitabine, for 28 days (acute group) or 90 days (chronic group). The parameters evaluated were weight variations, liver markers, histological alterations and presence of micronuclei. The results obtained a transient increase in the values of AST in animals of both sexes in the acute group tenofovir and tenofovir associated to emtricitabine, significant increase ($p < 0.05$) of the values of alkaline phosphatase in both male and female groups both acute and chronic and bilirubin values with a tendency to increase in the chronic group, although they were not significant, histological alterations (sinusoidal dilation, centrolobular fibrosis, parenchymal fibrosis and leukocyte infiltrate) mild and moderate in liver samples. No significant weight loss or presence of micronuclei in polychromatophil erythrocytes. Concluding that the observed changes suggest hepatic alterations (mild-moderate) and the need for a larger study to evaluate a possible obstruction in the hepatic bile ducts.

Keywords: antiretrovirals, Tenofovir, Emtricitabine, liver toxicity, micronuclei.

CAPITULO I

EL PROBLEMA

1.1 Planteamiento del Problema

El Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) ha sido reconocido como un importante problema de salud pública, por desarrollar infecciones oportunistas y enfermedades neoplásicas en pacientes con inmunosupresión progresiva infectados por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), que se han extendido ampliamente por el mundo en las últimas décadas (Cardona, 2015).

Hasta el momento han sido descriptos dos tipos del virus, VIH-1 y VIH-2. Ambos se encuentran asociados al síndrome de inmunodeficiencia humana (SIDA), la infección por el VIH-1 se encuentra difundida a nivel mundial, mientras que la infección por el VIH-2 se encuentra circunscripta a la región de África al Sur del Sahara causando una enfermedad similar al VIH-1 (Maartens, 2014).

Los dos virus tienen de 40 a 60% de homología de secuencia de aminoácidos, por lo que presentan similitudes en los mecanismos para la activación por la enzima transcriptasa reversa, el agotamiento de las células CD4⁺, sin embargo, el VIH-2 presenta períodos de latencia clínica mucho más largos, tasas significativamente más bajas de progresión y transmisión de la enfermedad y menor carga viral en la fase

asintomática en comparación con la infección por VIH-1. Todos estos hallazgos sugieren que en la infección por VIH-2, en contraste con el VIH-1, presenta un equilibrio distintivo entre el factor virológico y el inmunológico, lo cual debería facilitar una respuesta inmunológica mejor ajustada y a un mejor control de la infección (Azevedo-Pereira, 2016; Vidya, 2017).

La transcriptasa reversa es un paso esencial en la replicación retroviral del VIH, ya que es una enzima codificada para convertir sus genomas de ARN en ADN. El tratamiento antirretroviral utiliza medicamentos que inhiben la replicación viral e impiden la aparición de mutaciones de resistencia en el genoma del virus. En 1987 fue aprobado por la FDA el primer tratamiento contra la infección por VIH (Zidovudina). Su mecanismo consistía en inhibir la enzima transcriptasa reversa, lo que suponía en aquel entonces frenar la replicación del virus (Bernal, 2016).

Aunque todavía no existe tratamiento curativo, el desarrollo de diversos tipos de antirretrovirales ha permitido cambiar radicalmente el curso de la infección, convirtiendo una enfermedad mortal de corto plazo, en una condición con expectativa de vida prolongada (Maartens, 2014; Setkina, 2015). Sin embargo, éstos por sí solos no son suficientes para disminuir la carga viral. Es por ello, que son utilizadas combinaciones de antirretrovirales (de dos clases distintas), denominándose tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA). No obstante, muchos

tratamientos fracasan por múltiples causas, entre ellas: el tiempo de administración, aparición de resistencia y de efectos adversos y tóxicos, siendo la hepatotoxicidad una de las principales preocupaciones del médico tratante (Bajpai, 2017; Wang, 2019).

El Departamento de Salud y Servicios Sociales de los Estados Unidos, quien da las directrices para el uso de los agentes antirretrovirales en adultos y adolescentes infectados por el VIH-1, recomienda que la selección de un régimen debe ser individualizada sobre la base de eficacia virológica, los efectos adversos, la dosis, frecuencia de dosificación, el potencial de interacción de medicamentos, resultados de las pruebas de resistencia y las condiciones comórbidas, señalando como opciones para el inicio de la terapia antirretroviral los siguientes regímenes: Efavirenz + Tenofovir disoproxil fumarato + Emtricitabina; Atazanavir/ritonavir + Tenofovir disoproxil fumarato + Emtricitabina; Darunavir/ritonavir + Tenofovir disoproxil fumarato + Emtricitabina y Raltegravir + Tenofovir disoproxil fumarato + Emtricitabina; evidenciándose que tienen como denominador común la asociación de Tenofovir disoproxil fumarato + Emtricitabina. Cabe destacar que esta asociación también es usada en los protocolos de profilaxis preexposición (Cada, 2014; Günthard, 2016).

El tenofovir (TDF) es un análogo de nucleótidos acíclico de la adenina nucleósido monofosfato, indicado para el tratamiento de la infección por VIH-1, aprobado por la *Food and Drugs Administration* (FDA) en el año 2001 para uso en adultos. El nombre químico de tenofovir disoproxil fumarato es 9-[(R)-2-[[bis[[isopropoxicarbonil]oxi]metoxi]fosfinil]metoxi]propil] adenina fumarato (1:1). Tiene una fórmula molecular de $C_{19}H_{30}N_5O_{10}P \cdot C_4H_4O_4$ y un peso molecular de 635,52. Compite con el sustrato natural: deoxiadenosina 5 trifosfato, para incorporarse al ADN durante el proceso de transcripción del VIH. Una vez que se incorpora al ADN en formación, se produce una inhibición de la acción de la transcriptasa reversa, con lo que se previene la elongación de la cadena de ADN, produciendo la inhibición de la replicación viral (Chadwick, 2015; Lu, 2019).

El TDF produce toxicidad renal por acumulación en el túbulo renal proximal, que aparece más frecuentemente en pacientes con bajo peso, en los que se administran concomitantemente otros fármacos nefrotóxicos; ocasionando alteraciones del equilibrio ácido-base y electrolitos, proteinuria, disminución de la filtración glomerular o Síndrome de Fanconi (Repetto, 2009). Otros estudios clínicos lo asocian con neuropatías, miopatías, pancreatitis, esteatosis hepática y la toxicidad mitocondrial observada en pacientes con VIH debido a los recientes efectos secundarios adversos atribuidos a los compuestos relacionados a este fármaco (Chadwick, 2015; Wondifraw, 2017).

Con relación a la emtricitabina (FTC), la Guía del Medicamento publicada por FDA indica que fue aprobada en 2003 para su utilización, en combinación con otros fármacos antirretrovirales. El nombre químico es 5-fluoro-1-(2R,5S)-[2-(hidroximetil)-1,3oxatiolan-5-il] citosina. Tiene una fórmula molecular de $C_8H_{10}FN_3O_3S$ y un peso molecular de 247,24. Es el enantiómero negativo de un tiol análogo de la citidina con actividad contra Virus de la Hepatitis B (VHB) y VIH-1 al inhibir de forma competitiva la transcriptasa inversa, produciendo la interrupción de la cadena de ADN viral. Aunque suele ser bien tolerada, se han reportado con su uso, efectos adversos leves y poco frecuentes, tales como la cefalea, diarrea, náuseas, erupciones cutáneas y acidosis láctica con esteatosis hepática (Valade, 2014).

La hepatotoxicidad por medicamentos se debe a que el hígado sirve de primer paso en la biotransformación de estos y por la ausencia de membrana basal en el endotelio de los vasos sinusoides hepáticos, que, al distribuir la sangre por el órgano, permite el contacto directo de los xenobióticos circulantes con los hepatocitos, ocasionando daño citolítico o citotóxico, daño canalicular o la combinación de ambos en los hepatocitos (Repetto, 2009). Un estudio realizado por Mandala y cols., 2014, sobre la seguridad hepática y renal de tenofovir disoproxil fumarato en combinación con emtricitabina entre las mujeres africanas en una pre-exposición de un ensayo de profilaxis, evidenciaron que las mujeres asignadas al azar a esta combinación

tuvieron tasas más altas de toxicidad leve a moderada de las enzimas ALT y AST, y un aumento significativo desde el inicio hasta la cuarta semana en los valores de la enzima AST entre las mujeres que eran altamente adherentes a TDF-FTC durante ese intervalo.

Los criterios utilizados para la determinación de daño hepático incluyen al menos una de las siguientes alteraciones de los análisis bioquímicos hepáticos: 1) Aumento de ALT más de dos veces el límite alto de la normalidad; 2) Aumento de la concentración de bilirrubina directa sérica más de dos veces el límite alto de la normalidad; 3) Aumento de AST, fosfatasa alcalina (FA) y la concentración total de bilirrubina, siempre que uno de ellos supere más de dos veces el valor de referencia. En animales, la variación en el peso se considera un indicador de toxicidad (Flórez, 2008).

Así mismo, con el estudio histológico se observan respuestas generales que permite valorar posibles lesiones hepáticas, alteración en la proliferación celular y determinar la causa de las variaciones de las pruebas hepáticas. Estas respuestas son: inflamación, degeneración, necrosis, fibrosis y cirrosis (Kumar, 2008).

Adicionalmente, el ensayo de micronúcleos se utiliza para evaluar, *in vivo*, la inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. Los micronúcleos son

cuerpos citoplasmáticos de naturaleza nuclear, se corresponden con material genético no incorporado correctamente a las células hijas durante la división celular, reflejan aberraciones cromosómicas y se originan por roturas cromosómicas, errores durante la replicación y posterior división celular del ADN y/o por la exposición a agentes genotóxicos. Ésta prueba es ampliamente aceptada ya que permite un análisis sólido de las alteraciones de tipo estructural (efecto clastogénico) o alteraciones numéricas (efecto aneugénico) ocasionadas por los diferentes agentes. En la mayoría de las situaciones, se considera que un resultado positivo puede predecir el potencial de carcinogenicidad (Potén, 2013).

Una prueba que permite evaluar la genotoxicidad con una mayor sensibilidad y especificidad es el ensayo de micronúcleo de dosis repetidas en hepatocitos de rata adulta joven, por la acumulación de hepatocitos micronucleados inducida por la administración repetida de químicos genotóxicos (Shimada, 2015).

Con lo expuesto anteriormente, surgen las siguientes interrogantes: ¿Cuáles serán las modificaciones de las pruebas del perfil hepático y los cambios histológicos en hígado de ratas expuestas a la asociación de Tenofovir y Emtricitabina? ¿Cuál será la relación entre los posibles cambios con los diferentes antirretrovirales y el tiempo del tratamiento? ¿Existirá relación entre las modificaciones del perfil hepático, los cambios histológicos y la aparición de micronúcleos?

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo General:

Evaluar la toxicidad hepática inducida por la asociación de Tenofovir y Emtricitabina en un modelo experimental en ratas.

1.2.2 Objetivos Específicos:

- Determinar las variaciones de peso de las ratas de los grupos experimentales durante los periodos de 28 y 90 días de estudio.

- Determinar el perfil hepático (ALT, AST, Bilirrubina total y fraccionada, Fosfatasa alcalina) en ratas expuestas a tenofovir y tenofovir asociado a emtricitabina luego de 28 y 90 días de estudio.

- Determinar los cambios histológicos en el tejido hepático de ratas expuestas a tenofovir y tenofovir asociado a emtricitabina luego de 28 y 90 días de estudio.

- Determinar la presencia de micronúcleos en ratas expuestas a tenofovir y tenofovir asociado a emtricitabina luego de 28 y 90 días de estudio.

- Comparar la variación del peso de las ratas expuestas a tenofovir y tenofovir asociado a emtricitabina luego de 28 y 90 días de estudio de acuerdo con el sexo.
- Comparar los valores de ALT, AST, Bilirrubina total y fraccionada, Fosfatasa alcalina entre los grupos de estudio de acuerdo con el tiempo de exposición.
- Relacionar los valores de ALT, AST, Bilirrubina total y fraccionada, Fosfatasa alcalina de los grupos experimentales y el tiempo de exposición.
- Asociar los marcadores hepáticos y los cambios histológicos con el tratamiento antirretroviral y el tiempo de exposición.
- Asociar los marcadores hepáticos y la presencia de micronúcleos con el tratamiento antirretroviral y el tiempo de exposición.
- Asociar los cambios histológicos y la presencia de micronúcleos con el tratamiento antirretroviral y el tiempo de exposición.

1.3 Justificación

Según el informe anual (2018) de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA (ONUSIDA), a nivel mundial existen 36,9 millones de personas que padecen el VIH/SIDA, de los cuales 1,6 millones son nuevos casos de infección en adultos (personas de entre 15 y 49 años). El primer lugar lo ocupa África Oriental y del Sur, luego África Occidental y Central, seguido por África del Norte y del Medio Oriente, el cuarto lugar lo ocupa Asia y el Pacífico, el quinto lugar lo ocupa Latinoamérica, y las últimas posiciones el Caribe, Este europeo y Asia central, Europa occidental y Norteamérica. Se deduce, por tanto, que las regiones más desfavorecidas, con un menor nivel de ingresos económico y de desarrollo son las que se encuentran más afectadas por la epidemia.

En Venezuela, en el año 1981 se reportó el primer caso VIH/SIDA, y para el año 1999 había 8.047 personas registradas y 4.726 muertes, con un subregistro estimado del 80%. En el periodo 1986-1999 la tasa de mortalidad por SIDA se incrementó 10 veces (Guerra, 2009; Rodríguez, 2014).

En 2016, ONUSIDA informó que había 120.000 personas infectadas por el VIH, de las cuales aproximadamente un 61% tenía acceso a la terapia antirretroviral. Daniels, (2017) publica en la revista *The Lancet* un artículo sobre “La crisis económica de Venezuela obstaculiza el tratamiento del VIH / SIDA”, indicando que

los datos actuales de pacientes infectados por VIH estimados por ONUSIDA podrían estar muy por debajo de la realidad, debido al decrecimiento en la investigación de campo para recopilar datos.

En los últimos años, con la introducción de los antirretrovirales y más aún del TARGA, que es más rentable que otros regímenes terapéuticos disponibles hasta la fecha, se han logrado grandes avances en la lucha contra el VIH. Sin embargo, dado que los fármacos no pueden erradicar el virus, la cura todavía no es posible, y los pacientes tienen que mantener el cumplimiento de la medicación de por vida con el riesgo de reacciones adversas, interacciones farmacológicas y resistencia a los medicamentos (Maartens, 2014; Tse, 2015).

En este sentido, la presente investigación podría aportar información que contribuya a la detección precoz de daño hepático y efectos genotóxicos ocasionados por el uso del tratamiento antirretroviral, un mejor seguimiento y optimización del tratamiento antirretroviral en pacientes VIH, que conllevaría a una mejora de la calidad de vida del paciente y evitará la prolongación de estancias hospitalarias. Además de sentar las bases para futuras investigaciones que enriquezcan la línea de investigación del programa de Maestría en Toxicología Analítica.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de la investigación

Diversas investigaciones en humanos y animales han mostrado los efectos adversos y tóxicos de los antirretrovirales.

En relación con los estudios en humanos; Bejarano y cols., (2011), en Venezuela, estudió los efectos adversos de la terapia antirretroviral en pacientes menores de 15 años que acudieron a la consulta de infectología pediátrica del “Hospital Universitario Ángel Larralde”, durante el periodo de agosto 2008 a mayo 2009. Los medicamentos antirretrovirales evaluados en este estudio fueron: zidovudina, lamivudina, abacavir, didanosina, efavirenz y lopinavir/ritonavir. Los resultados mostraron que el 22,66% de los pacientes presentó hiperlipidemia, 18,66% intolerancia gastrointestinal, 17,33% hepatotoxicidad, 14,66% acidosis láctica, 13,33% rash cutáneo, 9,33% hiperglicemia, 6,66% lipohipertrofia y solo en el 2,66% se observó lipoatrofia. Concluyendo que los efectos adversos que prevalecieron fueron hiperlipidemia, intolerancia gastrointestinal y hepatotoxicidad.

Lourenço y cols, (2010) en Brasil, evaluó el potencial clastogénico y/o aneugénico de tres inhibidores nucleósidos de la transcriptasa reversa (zidovudina – AZT,

lamivudina-3TC y estavudina-d4T) usando el ensayo de micronúcleos bloqueando la citocinesis (CBMN) en cultivos de linfocitos humanos. Fueron obtenidos linfocitos de sangre periférica por punción venosa de 3 pacientes no fumadores que recientemente no habían sido expuestos a la radiación ionizante de forma significativa o mutágenos conocidos de inducir micronúcleos. Los resultados mostraron genotoxicidad a AZT y 3TC en células binucleadas sin aumento significativo en la frecuencia de micronúcleos en células mononucleadas en cualquiera de las concentraciones ensayadas, indicando que estos dos antirretrovirales no son agentes aneugénicos y que su genotoxicidad está relacionada con una acción clastogénico. El d4T mostró genotoxicidad en células binucleadas, y aumentó la frecuencia de micronúcleos en células mononucleadas, que indica acciones clastogénicas y aneugénicas.

En el 2016, Kovari y cols en Suiza, realizaron un estudio (*Data Collection on Adverse Events of Anti-HIV Drugs D:A:D*) con el objetivo de evaluar el riesgo de aumento crónico de alanino aminotransferasa y la administración de los medicamentos antirretrovirales en 21485 pacientes mono-infectados con VIH. Los medicamentos antirretrovirales evaluados en este estudio fueron: lamivudine, abacavir, didanosina, estavudina, emtricitabina, tenofovir disoproxil fumarato, nevirapina efavirenz y atazanavir. La exposición al tratamiento antirretroviral se categorizó como no expuestos y expuestos a corto o largo plazo (<2 años o ≥ 2 años, respectivamente), obteniendo como resultado que 6368 desarrollaron elevación

crónica de las enzimas hepáticas (incidencia 6.04 / 100 PY; intervalo de confianza [IC] del 95%, 5.89–6.19). La elevación crónica de enzimas hepáticas se asoció con la exposición a corto y largo plazo a didanosina, estavudina y tenofovir disoproxil fumarato y la exposición a corto plazo a nevirapina, efavirenz, emtricitabina y atazanavir. Concluyendo que, aunque se ha descrito que la didanosina, la estavudina, la nevirapina y el efavirenz son hepatotóxicos, también observaron una asociación consistente entre el tenofovir y la elevación crónica de enzimas hepáticas que emergen dentro de los primeros 2 años después del inicio del fármaco.

En el 2017 en Etiopia, Wondifraw y cols, realizaron un estudio retrospectivo con el registro del laboratorio clínico del Hospital de la Universidad de Gondar desde 2010 hasta el 2015, para evaluar el efecto del tratamiento antirretroviral sobre las funciones renal y hepática en 275 pacientes infectados por el VIH con más de 3 años con terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA). Los datos recopilados fueron edad, sexo, niveles sanguíneos de creatinina, nitrógeno ureico y alanino aminotransferasa; y el tratamiento antirretroviral fue: efavirenz, nevirapina, zidovudina, estavudina y tenofovir disoproxil fumarato. Los resultados mostraron que, el 62.2% de los participantes fueron mujeres, y la prevalencia general de la enfermedad renal crónica (ERC) antes y después del tratamiento fue de 3.6% y 11.7%, respectivamente. Este 11.7% de los pacientes con ERC estaban en la etapa 3 después del tratamiento. La prevalencia general de hepatotoxicidad fue del 6,5% y del 16,7% antes y después del tratamiento, respectivamente. Los grados de

hepatotoxicidad se clasificaron como Grado 1 cuando un valor ALT se encuentra entre 1.25 y <2.5 veces por encima del límite superior del valor normal (ULN por sus siglas en inglés), Grado 2 cuando un valor ALT se encuentra entre 2.5 y $<5.0 \times$ ULN, Grado 3 cuando un valor ALT se encuentra entre 5.0 y $<10 \times$ ULN, y Grado 4 cuando un valor ALT se encuentra en $\geq 10 \times$ ULN. La mayoría de los pacientes desarrollaron hepatotoxicidad de grado 2 (66.7% y 65.2% antes y después del tratamiento, respectivamente). Concluyendo que la prevalencia de nefrotoxicidad y hepatotoxicidad fue alta en los pacientes que tomaron TARGA. La nefrotoxicidad en estadio 3 y la hepatotoxicidad en grado 2 tuvieron la mayor incidencia de toxicidades totales, y el género femenino fue un factor de riesgo para la nefrotoxicidad.

En la India, Chowta y cols en el 2018, evaluaron el perfil de reacción adversa a medicamentos (RAM) en pacientes con VIH que reciben tratamiento antirretroviral de primera línea a través de un estudio prospectivo y observacional que incluyó 171 pacientes con VIH con un seguimiento a los seis meses. Ellos registraron los detalles demográficos, el historial médico, los detalles de la infección por VIH y el recuento de CD4 más reciente, la terapia antirretroviral y otros medicamentos concomitantes. Obteniendo como resultado que, de los 171 pacientes, 88 (51,5%) eran hombres y 83 (48,5%) mujeres. Las reacciones adversas observadas fueron: disminución en los valores de hemoglobina o presencia de anemia absoluta en respuesta a la zidovudina, síntomas no específicos como dolor de cabeza y una sensación no específica de malestar en respuesta a tenofovir, estavudina y efavirenz; dislipidemia, pancreatitis,

neuropatía periférica y acidosis láctica en respuesta a estavudina; erupción generalizada en respuesta a nevirapina y un caso de nefrotoxicidad a efavirenz.

En cuanto a estudios en animales, la revisión bibliográfica obtenida, presenta información valiosa sobre el comportamiento de xenobióticos citotóxicos en roedores que alteran la función hepática e inducen inestabilidad genética semejante a los objetivos del presente trabajo. Arencibia y col., (2011) determinaron la frecuencia espontánea e inducida de micronúcleos transplacentarios en ratones de la línea Balb/c pretendiendo vincular de esta forma el efecto genotóxico y reproductivo de una droga a evaluar por esta metodología. Para ello, formaron 4 grupos experimentales, el primero un control negativo, el segundo control solvente NaCl (0,9%), en el tercero se utilizó la ciclofosfamida en dosis de 50 mg/kg, y el cuarto se utilizó la bleomicina en dosis de 20 mg/kg. Todos los grupos se administraron por vía intraperitoneal los días 14, 15 y 16 de la gestación y 24 h después de la última inoculación se procedió al sacrificio de las gestantes por dislocación cervical. Obteniéndose como resultado los valores espontáneos e inducidos de los índices de citotoxicidad y de genotoxicidad, así como el total de micronúcleos divididos según niveles de daños. Se observó mayor inducción de daño en células hepáticas fetales que en médula ósea materna. Además, se demostró que la ciclofosfamida es capaz de inducir mayor citotoxicidad y genotoxicidad que la bleomicina tanto en células de la médula ósea materna como en células hepáticas fetales. Por tanto, se demostró el poder clastogénico transplacentario de ambos mutágenos vinculando este ensayo de genotoxicidad a la reproducción.

Por otro lado, Adaramoye y cols., (2012) evaluaron el efecto de tenofovir, sobre los índices funcionales hepáticos y renales de ratas Wistar y el papel protector de la vitamina E, evidenciando que la administración de tenofovir (TRF) causó un aumento significativo ($p < 0,05$) en los niveles de urea en suero, creatinina, glucosa en orina, y proteínas en un 65%, 51%, 88%, y 79%, respectivamente, en comparación a los controles. Esto fue seguido por una disminución significativa ($p < 0,05$) del aclaramiento de creatinina. No hubo diferencias significativas ($p > 0,05$) en las actividades de las aminotransferasas séricas, γ -glutamyl transferasa y fosfatasa alcalina en relación con los controles. La suplementación con vitamina E mejoró los efectos inducidos por TRF. Los datos bioquímicos fueron apoyados por hallazgos histopatológicos. No hubo lesiones visibles en los cortes de hígado de las ratas control, TFR + Vit E- y Vit E, pero si hubo un corte de hígado con necrosis leve de una rata tratada con TFR. Concluyendo que el TFR altera los marcadores de función renal en las ratas, mientras que la administración de suplementos de vitamina E atenúa estos efectos.

Luego, Ng y cols (2015) en Estados Unidos hicieron un análisis toxicológico, toxicocinético y toxicogenético en ratones luego de ser expuestas a Tenofovir Disoproxil Fumarato por 13 semanas. El estudio consistió en exponer ratones BALB/c hembra a 0, 50, 500 o 1000 mg/kg de TDF, una vez al día mediante sonda oral, durante 1, 28 o 91 días. Los efectos en respuesta al tratamiento con TDF parecieron ocurrir de una manera dependiente de la dosis. En los días 36 y 43, se

observaron pesos corporales medios significativamente más bajos en ratones tratados con 1000 mg/kg en comparación con los animales control ($p < 0,05$). Histológicamente se evidenció hepatomegalia en ratones tratados con 1000 mg/kg de TDF después de 4 y 13 semanas de tratamiento. El análisis de microarray en el hígado mostró 11 genes con al menos 2 cambios transcripcionales en los ratones tratados con TDF de 1000 mg/kg en comparación con los controles en el Día 92. La transcripción del gen *Cdkn1a*, inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 1A (p21), en el hígado del grupo de dosis de 1000 mg/kg fue 3.7 veces mayor que en el grupo control. Concluyendo que este aumento del nivel de *Cdkn1a* pudo haber contribuido a la inhibición de la progresión del ciclo celular en G1, causando la hepatomegalia.

2.2 Bases Teóricas

Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA)

El síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) se define como la infección por el virus de inmunodeficiencia humana con un recuento de linfocitos T CD4+ menor de 200/ μ L, sin importar si presenta o no los síntomas de una o varias enfermedades oportunistas. El VIH es el agente etiológico del SIDA, y pertenece a la familia de retrovirus humanos *Retroviridae* dentro de la familia lentivirus, y existen dos tipos los cuales son el VIH-1 y VIH-2. El VIH se transmite a través de los fluidos corporales humanos por tres vías principales: relaciones sexuales; inyección directa con medicamentos, agujas, jeringas, sangre o productos sanguíneos contaminados con VIH; y de la madre infectada con VIH al feto en el útero, a través de la inoculación intraparto de la madre al bebé o durante la lactancia materna. Ataca específicamente a las células que expresan el receptor CD4, una de las más importantes son los linfocitos T CD4+ y entra en ellos. Una vez dentro, el virus transforma su material genético de cadena simple (ARN) a uno de cadena doble (ADN) para incorporarlo al material genético propio del huésped (persona infectada) y lo utiliza para replicarse o hacer copias de sí mismo. Cuando las nuevas copias del virus salen de las células a la sangre, buscan a otras células para atacar. Mientras, las células de donde salieron mueren. Este ciclo se repite una y otra vez (Tse, 2015).

Epidemiológicamente, los primeros signos de la epidemia surgieron en 1981, cuando un grupo de pacientes homosexuales fueron diagnosticados con varios tipos de infecciones oportunistas, el sarcoma de Kaposi y neumonía en Nueva York, San Francisco y Los Ángeles. La identificación de un retrovirus como el agente infeccioso siguió y se confirmó por muchos laboratorios. Poco después, la epidemia fue reconocida en todo el mundo como una infección crónica y permanente convirtiéndose en el más desafiante problema de salud en los últimos tiempos (Chowta, 2018).

Estructuralmente, el VIH es un retrovirus de genoma pequeño de ARN de 9300 pares de bases. Dentro de un centro de nucleocápside están dos copias del genoma, rodeadas por una bicapa de lípido, proveniente de la membrana plasmática del hospedador. El genoma viral codifica tres codones de lectura abierta: *gag* codifica una poliproteína que es procesada hasta liberar las principales proteínas estructurales del virus; *pol* se traslapa con *gag* y codifica tres importantes actividades enzimáticas: una ADN polimerasa que depende de ARN o transcriptasa inversa con actividad ARNasa, proteasa e integrasa viral; y *env* codifica la gran proteína de la cubierta de la transmembrana encargada de la unión a la célula y la penetración del virus. Algunos genes pequeños codifican proteínas reguladoras que intensifican la producción del virus o combaten las defensas del hospedador, incluyen *tat*, *rev*, *nef* y *vpr* (Brunton, 2012).

Li y De Clercq (2016), describen el ciclo del virus en nueve etapas:

(1) Los viriones del VIH maduros se dirigen a las células huésped mediante la unión directa al receptor celular CD4 y los co-receptores de quimiocina (CCR5 y CXCR4).

(2) La transcriptasa inversa del VIH en el complejo de transcriptasa inversa produce ADN bicatenario (ADNds) a partir de ARN monocatenario.

(3) El complejo de preintegración del VIH (PIC) transporta el ADNds viral al núcleo ingresando en el complejo de poros nucleares. Durante la transcripción previa a la integración, se sintetizan tres proteínas virales (*Rev*, *Tat* y *Nef*) a partir de ADNds no integrado. En presencia de cofactores celulares, el PIC se dirige a las regiones cromosómicas del hospedador con alta actividad transcripcional, donde el ADNds viral se integra en los cromosomas del hospedador.

(4) Las proteínas virales (*Tat* y *Nef*) secuestran mecanismos de transcripción celular para activar la síntesis de ARNm viral a partir de ADNds viral integrado. VIH *Rev* recluta CRM1, RanGTP y otras proteínas hospedadoras para exportar ARNm virales al citoplasma.

(5) Los ARNm virales se traducen en proteínas (precursoras) en los compartimentos celulares. Los ARNm virales de *Gag*, *GagPol* y la mayoría de las proteínas accesorias se traducen en polisomas citosólicos, excepto *Env* y *Vpu*. En el citoplasma, la *Vpr* madura interactúa con las proteínas del huésped (DCAF1 y SLX4) para inducir la detención del ciclo celular G₂/M, *Vif* activa la degradación de las proteínas APOBEC3 y *Nef* desempeña múltiples funciones en diferentes compartimientos celulares basados en las interacciones de la proteína VIH-huésped. En el retículo

endoplasmático, el ARNm de *Vpu* del VIH-1 se traduce, y el *Vpu* maduro retiene el CD4 recién sintetizado. El CD4 dislocado posteriormente sufre una degradación lisosomal y/o proteasomal. Tetherina también es objetivo de *Vpu* en el retículo endoplasmático, y posteriormente se envía a las vías de degradación lisosomal y/o proteasomal. En el retículo endoplasmático, se producen modificaciones de *Env*, como la escisión del péptido señal, el plegamiento, la trimerización y la glicosilación. En el aparato de Golgi, las proteasas celulares (por ejemplo, la furina) escinden las glucoproteínas *Env* en gp120 y gp41, que posteriormente se ensamblan en picos *Env* a través de interacciones no covalentes. La mayoría de las proteínas *Env* retenidas en el retículo endoplasmático o en el aparato de Golgi están degradadas y solo una pequeña proporción llega a la membrana celular. *Env*, *Vpr*, *Tat* y *Nef* viajan a la membrana celular a través de vías secretoras.

(6) Los viriones de VIH nacientes se ensamblan con dos ARNm genómicos, proteínas virales (*Gag*, *GagPol*, *Env*, *Vif*, *Vpr* y *Nef*) y cofactores celulares (por ejemplo, actina, tRNA^{Lys3} y TIP47). Las partículas nacientes del VIH se desprenden de la membrana celular para infectar otras células huésped. VIH-1 *Nef* induce la degradación de CD4 para prevenir la interacción *Env*-CD4 en la membrana extracelular.

(7) La proteasa del VIH divide los precursores de *Gag* y *GagPol* en proteínas estructurales (matriz, cápside, nucleocápside y p6) y enzimas virales (proteasa, transcriptasa reversa e integrasa), transformando así los viriones inmaduros en viriones maduros para nuevas infecciones.

(8) Como una ruta alternativa de brotes virales, los viriones nacientes del VIH se liberan mediante el uso de vías de exocitosis.

(9) Como una ruta alternativa de entrada viral, los viriones maduros del VIH ingresan a las células del hospedador a través de las vías endocíticas.

El conocimiento de las diferentes etapas del ciclo de replicación del VIH dio paso al primer ensayo de un medicamento con actividad antirretroviral (zidovudina) que se completó en 1986, en el cual, se incluyeron pacientes con infección por VIH-1 y se demostró una reducción significativa de la mortalidad frente al grupo placebo. En 1987 fue aprobado por la FDA para el tratamiento de la infección por VIH. A partir de entonces, se precisaron más de 20 medicamentos con actividad antirretroviral derivados de diferentes clases: Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos y nucleótidos (ITIAN), Inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósidos (ITINN), Inhibidores de la proteasa (IP), Inhibidores de la entrada, Inhibidores de la integrasa (IIN). En 1996 la estrategia consistió en combinar tres o más medicamentos (habitualmente dos ITIAN más un ITINN, o bien dos ITIAN más un IP), monitorizando la respuesta terapéutica mediante la medición de la carga viral plasmática y conteo de linfocitos T CD4, lo que representó una disminución de las complicaciones clínicas y aumento de la supervivencia (Bernal, 2016).

Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos y nucleótidos (ITIAN)

Son fármacos que inhiben la transcriptasa inversa del VIH por un mecanismo competitivo con los nucleósidos/nucleótidos fisiológicos, de los que difieren únicamente en pequeños cambios en la molécula de ribosa. Los ITIAN se incorporan a la cadena de ADN viral, interrumpiendo la elongación de esta y, como consecuencia, la replicación viral.

Se dividen en análogos de bases púricas: adenosina (didanosina ddl) y guanosina (abacavir ABC) y análogos de bases pirimidínicas: timidina (zidovudina ZDV y estavudina d4T) y citidina (emtricitabina FTC, lamivudina 3TC). Estos fármacos requieren tres fosforilaciones en el interior de la célula para activarse. En cambio, tenofovir (TDF) es un análogo de nucleótidos (análogo de adenina), por lo que requiere una fosforilación menos para activarse.

En el metabolismo de los ITIAN no interviene el sistema enzimático del citocromo P450 y estos fármacos son poco susceptibles de padecer interacciones metabólicas relevantes. ZDV y ABC se glucuronidan, por lo que otros fármacos que afecten la glucuronidación pueden modificar sus concentraciones. Sin embargo, las interacciones de los análogos de nucleósidos se deben fundamentalmente a la potenciación de su toxicidad, por ej. anemia con la asociación de AZT a ribavirina, cotrimoxazol, o ganciclovir, entre otros. No se recomienda la asociación de ribavirina

y didanosina por aumento del riesgo de toxicidad mitocondrial (pancreatitis, acidosis láctica). En lo posible se evitará también el uso simultáneo de ribavirina con ZDV o d4T por toxicidad hematológica o mitocondrial (Pau, 2014; Bernal, 2016).

La resistencia de clase más característica del VIH a los ITIAN se debe a la aparición de combinaciones variables de las mutaciones denominadas TAM o NAM (thymidine or nucleoside associated mutations). Son 6 mutaciones en la región del gen *pol* del VIH que codifica la transcriptasa inversa: M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y/F, K219Q/E. El grado de resistencia a los diferentes ITIAN depende del número y de las mutaciones presentes. Además, existen unas mutaciones en aquel mismo gen que confieren resistencia concreta a uno o varios ITIAN. Así, la mutación M184V/I confiere resistencia completa a lamivudina y emtricitabina, la L74V es característica de didanosina y la K65R disminuye la sensibilidad a los ITIAN no timidínicos. Con muy poca frecuencia pueden seleccionarse complejos de multirresistencia a los ITIAN. El complejo de la 151 (A62 V, V75I, F77L, F116Y, Q151M) afecta a todos los nucleósidos a excepción del tenofovir. El complejo de inserción 69 (M41L, A62 V, 69 inser, K70R, L210W, T215Y/F, K219Q/E) afecta a todos los ITIAN (Ribera, 2011).

Emtricitabina

Es un enantiómero negativo sintético análogo fluorado del nucleósido cistina utilizado como parte del tratamiento de primera línea con actividad contra Virus de la

Hepatitis B (VHB) y VIH-1. Entra en las células por difusión pasiva y es fosforilada por la desoxicitidina cinasa y las cininas celulares hasta la forma de su metabolito activo 5'-trifosfato de emtricitabina. Inhibe la síntesis del ADN vírico al competir con su sustrato natural (deoxicitidina 5'-trifosfato) por su incorporación al mismo y también inhibe la elongación de la cadena de ADNc vírico. Tiene una alta biodisponibilidad oral (93%) que no es influida por la presencia de alimentos. Se une poco (<4%) a proteínas plasmáticas. Posee una vida media plasmática de 8-10 horas y una intracelular de 39 horas. Se elimina por filtración glomerular y por secreción tubular activa, recuperándose un 86% en orina y un 14% en heces, habitualmente inalterada, aunque una pequeña porción lo hace en forma de metabolitos. Se administra en dosis única diaria 200 mg. Existen coformulaciones con uno o dos fármacos: Truvada® comprimidos con emtricitabina 200mg y tenofovir 245mg y Atripla® comprimidos que contienen emtricitabina 200mg, tenofovir 300mg y efavirenz 600mg (Flórez, 2008; Valade, 2014; Bernal, 2016).

Tenofovir

El tenofovir disoproxil fumarato (tenofovir DF) es un profármaco usado como tratamiento contra el VIH y Hepatitis B crónica en pacientes adultos. Es convertido por las esterasas séricas y tisulares en tenofovir, que es un compuesto monofosfato, por lo que en el interior de la célula sólo debe ser bifosforilado. Esta función la llevan a cabo las enzimas adenilato cinasa y nucleótido difosfato cinasa, presentes tanto en células en reposo como en división, y da lugar al tenofovir bifosfato, que es la forma

activa del fármaco. El tenofovir bifosfato es un inhibidor competitivo de las retrotranscriptasas virales y es incorporado en el ADN del VIH para que termine la cadena, porque posee un anillo incompleto de ribosoma. El bifosfato muestra escasa afinidad por las polimerasas α , β , y γ del ADN del ser humano, que es la base de su toxicidad selectiva. La forma de profármaco mejora la biodisponibilidad oral, que alcanza el 40% y mejora con la administración simultánea de alimentos. Posee una vida media plasmática de 12-18 horas y una intracelular de 12-50 horas. La eliminación renal es por filtración glomerular y por secreción tubular. Se administra en dosis única diaria de 300 mg por vía oral, y de ser posible con alimentos (Flórez, 2008; Ng, 2015).

Los efectos adversos más característicos de los ITIAN aparecen a largo plazo y se relacionan con su toxicidad mitocondrial. Los mecanismos de disfunción mitocondrial y celular son complejos, destacando entre otros el hecho de que estos fármacos, además de inhibir la transcriptasa inversa viral, pueden inhibir la ADN polimerasa gamma mitocondrial. Aunque por su mecanismo de acción todos los análogos pueden producir toxicidad mitocondrial, se produce con más frecuencia con los análogos de timidina. Las manifestaciones clínicas pueden ser muy variables: miopatía, neuropatía, esteatosis hepática y acidosis láctica, pancreatitis y lipoatrofia periférica (Bernal, 2016).

La toxicidad hepática constituye una de las reacciones adversas más frecuentes por el uso de TARGA. Los procesos morfológicos como respuesta del hígado a agentes nocivos son:

- **Inflamación:** lesión a los hepatocitos acompañada de flujo interno agudo o crónico de las células inflamatorias dentro del hígado, también conocido como hepatitis. La inflamación puede limitarse al sitio de entrada de los leucocitos (fascículos portales) o dispersarse en el parénquima.
- **Degeneración:** daño por agresión tóxica o inmunológica que puede ocasionar que los hepatocitos adopten un aspecto hinchado, edematoso (degeneración globosa) con grumos citoplasmáticos irregulares y amplios espacios claros. En forma alternativa es posible que el material biliar retenido confiera al hepatocito un aspecto difuso, espumoso, hinchado (degeneración espumosa). En hepatocitos viables pueden acumularse sustancias como gotas de grasa conocido como esteatosis. Múltiples gotas finas que no desplazan el núcleo se denominan esteatosis microvesicular y cuando se observa una sola gota de gran tamaño que desplaza al núcleo se denomina esteatosis macrovesicular.
- **Necrosis:** cualquier agresión significativa al hígado. En la necrosis isquémica se conservan hepatocitos momificados y pocos teñidos (necrosis coagulativa). En la necrosis mediada por tóxicos o inmunológicamente, los hepatocitos aparecen como corpúsculos de Councilman arrugados, picnóticos, muy eosinófilos. Esta forma de necrosis al parecer es consecuencia de apoptosis. De manera alternativa fuerzas

osmóticas pueden hinchar y romper los hepatocitos, la llamada degeneración hidrópica o necrosis lítica.

La necrosis muestra una distribución zonal: Necrosis centrilobulillar donde la necrosis de los hepatocitos está situada inmediatamente alrededor de la vena central; necrosis focal cuando se limita a células dispersas dentro de los lobulillos hepáticos; necrosis fragmentada cuando se limita a la interfase entre el parénquima periportal y los fascículos portales inflamados. Con lesión inflamatoria más grave la necrosis de hepatocitos contiguos puede abarcar lobulillos adyacentes en forma de portal-portal, portal-central o central-central (necrosis en puente). La necrosis de todo lóbulo (necrosis submasiva) o la de mayor parte del hígado (necrosis masiva) en general acompañada de insuficiencia hepática.

- **Fibrosis:** el tejido fibroso se forma como respuesta a inflamación o agresión tóxica directa al hígado. El depósito de colágena tiene consecuencias persistentes sobre los patrones hepáticos de flujo y riego sanguíneo de los hepatocitos. En las etapas iniciales se puede observar fibrosis dentro o alrededor de los fascículos portales o de la vena central o la colágena puede depositarse directamente dentro de las sinusoides. Con el tiempo bandas fibrosas unen las regiones del hígado y este proceso se denomina puente de fibrosis. Por lo general, la fibrosis es una consecuencia irreversible del daño hepático.
- **Cirrosis:** es la etapa donde el avance de la fibrosis y la lesión parenquimatosa ocasionan que el hígado se subdivida en nódulos de hepatocitos en etapa de regeneración rodeadas por tejido cicatrizal (Kumar, 2008).

Además del estudio histopatológico, las pruebas de genotoxicidad facilitan el desarrollo de estrategias de intervención precoz frente a diferentes agentes químicos, ya que su función es el de proteger la integridad física del fondo común de genes. Una de estas pruebas es el ensayo de micronúcleos.

Micronúcleos

W. H. Howell y J. Jolly fueron los primeros investigadores en describir pequeñas inclusiones en la sangre extraída de gatos y ratas a finales del siglo XIX. Estas pequeñas inclusiones, posteriormente denominadas cuerpo de Howell-Jolley, fueron observadas en los eritrocitos de la sangre periférica de los pacientes con anemia grave. En la década de 1950, J. M. Thoday describió cuerpos similares; fue él quien los denominó fragmentos nucleares o micronúcleos. Esto generó muchas investigaciones donde varios autores utilizaron la presencia de micronúcleos para detectar el potencial de efectos adversos hereditarios de los productos químicos (Hayashi, 2016).

Evans y colaboradores en 1970, fueron los primeros en utilizar los micronúcleos como una medida de daño por exposición a radiación. Posteriormente, Booler y Schmid desarrollaron un método para evaluar la frecuencia de los eritrocitos micronucleados entre los eritrocitos normales utilizando médula ósea y células de sangre periférica del hámster chino tratados con un agente alquilante fuerte, trenimon, denominando a este método como "Mikrokern-Test (prueba de micronúcleos)". En

1976, Countryman y Heddle publicaron un método que utilizaba linfocitos cultivados en humanos. Fenech y Moley lo modificaron mediante el uso de citocalasina B y ahora el método se usa ampliamente para el monitoreo humano. A finales de 1970, Cole y colaboradores y King y Wild observaron una inducción del micronúcleo que aparece en el hígado de ratón fetal y en las células de la sangre periférica en la etapa muy avanzada de la gestación, cuyas madres fueron tratadas por vía intraperitoneal con un químico clastogénico. Luego en 1983, Hayashi y cols. y MacGregor y cols. introducen el método de tinción de fluorescencia. Hayashi utilizó naranja de acridina, mientras que MacGregor utilizó Hoechst 33258 y pironina Y. Estos métodos específicos de ADN y ARN contribuyeron a aumentar la precisión de la puntuación de eritrocitos inmaduros micronucleados. Mas tarde, Hayashi y cols. informó el método para aislar los micronúcleos de la sangre periférica y para distinguir entre los micronúcleos con y sin centrómero. Es por ello, que desde principios de la década de 1980, algunos países, así como organizaciones internacionales, comenzaron a hacer sus propias pautas de prueba para evaluar la evaluación de seguridad de los productos químicos, entre ellas se encuentran: el Grupo de Estudio de Colaboración para la Prueba de Micronúcleo del Grupo de Estudio de Mutagenicidad de Mamíferos, que es una sub-organización de la Sociedad de Mutagen Ambiental de Japón (CSGMT / JEMSMMS), el comité del programa US-EPA Gene Tox, el Taller Internacional sobre Estandarización de los Procedimientos de Pruebas de Genotoxicidad (IWGT) (Hagio, 2014; Uno, 2014; Hayashi, 2016).

Los micronúcleos constituyen un biomarcador de efecto genotóxico ya que éstos son cuerpos extranucleares que se formaron durante la mitosis en la transición de metafase–anafase y pueden ser cromosomas completos rezagados por daño al huso mitótico (efecto aneuploidógeno), o bien fragmentos de cromosomas sin centrómero (daño clastogénico); en cualquiera de los casos, no lograron incorporarse a ninguno de los núcleos de las células hijas. Los micronúcleos se pueden diferenciar unos de otros por su tamaño o la presencia del centrómero o cinetócoro. Estos eventos pueden ocurrir espontáneamente; sin embargo, dichos fenómenos se incrementan en presencia de ciertas condiciones endógenas o exógenas. Así, la presencia de micronúcleos puede emplearse como indicador del efecto de agentes mutágenos, genotóxicos o teratógenos, principalmente micronucleogénicos. Para realizar la prueba de micronúcleo es frecuente usar medula ósea o sangre periférica, sin embargo, son menos sensible a los carcinógenos que requieren la activación metabólica, el tiempo de vida de los eritrocitos es de 120 días y el tiempo de vida útil del metabolito en estudio pudiera ser muy corto como para llegar a la medula ósea y generar daño. Por lo tanto, una prueba de micronúcleos en hígado sería un método útil para evaluar la genotoxicidad de los hepatocarcinógenos, la cual consiste en contabilizar los eritrocitos normocromatófilos (EN), eritrocitos policromatófilos (EP) y la frecuencia de EP portadores de micronúcleos, presente en el tejido hepático (Arencibia, 2011; Hagio, 2014; Shimada, 2015).

2.3 Sistema de variables

Variables Independientes:

- Exposición a diferentes combinaciones de antirretrovirales.

Variables Dependientes:

- Variación de peso.
- Marcadores bioquímicos: Bilirrubina total y fraccionada, Transaminasas (ALT y AST) y Fosfatasa alcalina.
- Cambios histológicos en el tejido hepático.
- Presencia de micronúcleos en hepatocitos.

2.4 Formulación de Hipótesis

Hipótesis operacional:

La exposición a las asociaciones de tenofovir y emtricitabina tiene un efecto hepatotóxico en ratas.

Hipótesis nula

La exposición a las asociaciones de tenofovir y emtricitabina no tiene un efecto hepatotóxico en ratas.

2.5 Operacionalización de las Variables

VARIABLE	DEFINICION CONCEPTUAL	DIMENSION	INDICADOR
Hepatotoxicidad	Es la lesión o daño hepático causado por la exposición a un medicamento u otros agentes no farmacológicos.	<ul style="list-style-type: none"> -Variación de peso. - Marcadores Bioquímicos en ratas expuestas - Cambios histológicos en el tejido hepático de ratas expuestas. - Micronúcleos 	<ul style="list-style-type: none"> -Variación en comparación a su peso basal. - Niveles sanguíneos de: ALT, AST, Bilirrubina Total y Fraccionada, Fosfatasa alcalina. - Inflamación - Degeneración - Necrosis - Fibrosis - Cirrosis Presencia de micronúcleos en hepatocitos.
Tratamiento Antirretroviral	Consiste en tomar a diario una combinación (un régimen) de medicamentos contra el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH).	<ul style="list-style-type: none"> Asociación del tratamiento antirretroviral Tiempo de Exposición 	<ul style="list-style-type: none"> -Tenofovir -Tenofovir/Emtricitabina 28 días (Proceso Agudo) 90 días (Proceso Crónico)

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

3.1 Tipo de investigación

Está basada en un estudio básico de tipo experimental, ya que se manipulan intencionalmente las variables, para analizar las consecuencias dentro de una situación de control para el investigador (Hernández-Sampieri, 2018).

3.2 Nivel o modalidad de la investigación

Este diseño corresponde a un estudio de nivel explicativo, debido a que se establecerá la direccionalidad de las variables del estudio, se centra en explicar por qué ocurre un fenómeno y en qué condiciones se da éste (Hernández-Sampieri, 2018).

3.3 Muestra

Para el estudio se utilizaron 70 ratas albinas *Sprague dawley* (37 machos y 33 hembras), adultas jóvenes, con pesos iniciales entre 191,4 – 324,40 g, suministrados por el Bioterio Central de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Carabobo; con acceso *ad libitum* al agua y al alimento. Una semana antes del comienzo del estudio, los animales fueron trasladados al Bioterio del Departamento de parasitología de la Universidad de Carabobo para su adaptación. El tratamiento

antirretroviral usado en este estudio fue generosamente donado por la Fundación Mavid Carabobo, Estado Carabobo Venezuela.

Los animales se dividieron al azar en 12 grupos de la manera siguiente:

Grupo 1a (GMC): Control negativo machos: 6 ratas machos a las que sólo se les administró por vía oral solución fisiológica y no recibieron tratamiento antirretroviral por 28 días.

Grupo 2a (GHC): Control negativo hembras: 6 ratas hembras a las que sólo se les administró por vía oral solución fisiológica y no recibieron tratamiento antirretroviral por 28 días.

Grupo 3a (GMT): 6 ratas machos a las que se les administró por vía oral 15mg/kg/día de tenofovir solo por 28 días.

Grupo 4a (GHT): 7 ratas hembras a las que se les administró por vía oral 15mg/kg/día de tenofovir solo por 28 días.

Grupo 5a (GMTE): 7 ratas machos a las que se les administró por vía oral 15mg/kg/día de tenofovir + 10mg/kg/día de emtricitabina por 28 días.

Grupo 6a (GHTE): 7 ratas hembras a las que se les administró por vía oral 15mg/kg/día de tenofovir + 10mg/kg/día de emtricitabina por 28 días.

Grupo 1b (CGMC): Control negativo machos: 6 ratas machos a las que sólo se les administró por vía oral solución fisiológica y no recibieron tratamiento antirretroviral por 90 días.

Grupo 2b (CGHC): Control negativo hembras: 4 ratas hembras a las que sólo se les administró por vía oral solución fisiológica y no recibieron tratamiento antirretroviral por 90 días.

Grupo 3b (CGMT): 6 ratas machos a las que se les administró por vía oral 15mg/kg/día de tenofovir solo por 90 días.

Grupo 4b (CGHT): 4 ratas hembras a las que se les administró por vía oral 15mg/kg/día de tenofovir solo por 90 días.

Grupo 5b (CGMTE): 6 ratas machos a las que se les administró por vía oral 15mg/kg/día de tenofovir + 10mg/kg/día de emtricitabina por 90 días.

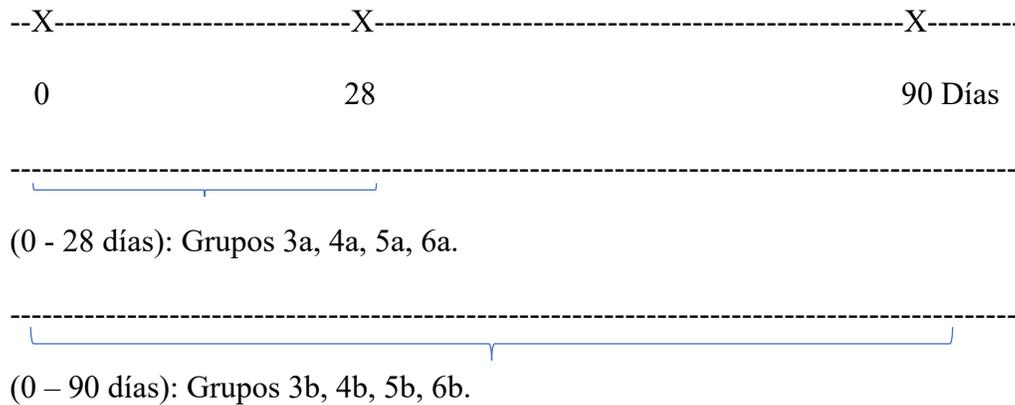
Grupo 6b (CGHTE): 5 ratas hembras a las que se les administró por vía oral 15mg/kg/día de tenofovir + 10mg/kg/día de emtricitabina por 90 días.

Procedimiento:

El día cero (0) de investigación se inició el tratamiento con los antirretrovirales, según el caso a todos los grupos; excepto los grupos 1a, 2a y 1b, 2b que recibieron solución fisiológica durante todo el periodo experimental de 28 días ó 90 días respectivamente.

El día 28 de experimentación culminó el tratamiento con los antirretrovirales de los grupos 3a, 4a, 5a y 6a.

El día 90 de experimentación culminó la administración de los antirretrovirales de los grupos 3b, 4b, 5b y 6b.



3.4 Técnica de recolección de la información

A través de una base datos, se hizo un registro diario de observación y todos los animales del estudio fueron pesados el día 0 y luego semanalmente, siempre a la misma hora para evitar errores. Se realizaron análisis bioquímicos de las muestras extraídas de los diferentes grupos en estudio, así como cortes histológicos para el estudio morfológico y la prueba de micronúcleos.

Consideraciones éticas

Este trabajo de investigación se rige por el Código de Núrnberger (1946-1947) que define las condiciones del experimento humano basado en los resultados de la investigación animal; los contenidos éticos de la Declaración de Helsinki (1964), donde la investigación médica en sujetos humanos debe estar basada en pruebas de laboratorio adecuadamente realizadas y experimentación con animales.

Además, se ajustó a las normas internacionales para la investigación biomédica con animales, dictadas por el Consejo Internacional para la Investigación Biomédica en Animales (CIOMS), establecido por la UNESCO en 1949, que afirma que el empleo de animales en las investigaciones implica responsabilidad por su bienestar; y por la Declaración Universal de Derechos de los Animales (1977) aprobada por la ONU y la UNESCO, en la cual, su artículo 8 establece que la experimentación animal que implique un sufrimiento físico o psicológico es incompatible con los derechos del animal, tanto si se trata de experimentos médicos, científicos, comerciales, como de otra forma de experimentación y que deben ser utilizadas y desarrolladas técnicas alternativas.

También se adoptaron los códigos y normativas establecidos en Venezuela: El Código de Ética para la Vida (2010) del Ministerio del Poder Popular para la Ciencia,

Tecnología e Industrias Intermedias de la República Bolivariana de Venezuela publicado a través de la Comisión de Ética y Bioética y Biodiversidad (CeBioBio) que establece en su capítulo III las normas generales para la adecuada utilización de los animales en la experimentación de laboratorio, después de considerar debidamente la necesidad de su utilización y en los estudios de sus patologías y de su comportamiento natural, obtenidos en sus hábitats y bioterios; y el manual elaborado por la Asociación Venezolana para la Ciencia de los Animales de Laboratorio (AVECAL, 2008), que establece las directrices para la producción y uso ético de los animales usados en la investigación (Aular, 2018). Adicionalmente, se aplicó el enunciado de “las tres erres” de William Russell y Rex Burch (1959) y los lineamientos de OECD TG 474 para omitir la presencia de un grupo control positivo en este estudio.

3.5 Recolección de las muestras

Los días 0,14 y 29 al grupo agudo (a) y los días 0,14, 29, 60 y 91 al grupo crónico (b) se extrajo (previo ayuno de 12 horas) una muestra de 2mL de sangre por punción cardíaca a los animales de experimentación, se colocaron en tubos sin anticoagulante para la determinación de los marcadores bioquímicos (transaminasas ALT – AST, bilirrubina total y fraccionada y fosfatasas Alcalina). El día 29 de experimentación, los animales de los grupos 1a, 2a, 3a, 4a, 5a, 6a; y el día 91 de experimentación los

animales de los grupos 1b, 2b, 3b, 4b, 5b, 6b, fueron sacrificados por contusión cervical (de acuerdo al método establecido por el *1993 Report of the AVMA Panel on Euthanasia*), se les practicó una incisión a nivel abdominal, se extrajeron los hígados, y se lavaron con solución fisiológica, posteriormente se seccionaron en dos fragmentos (uno de ellos para el análisis anatomopatológico y el otro para realizar la prueba de micronúcleos) y colocados en formol-buffer al 10% para su conservación hasta el momento de realizar el análisis anatomopatológico y la prueba de micronúcleos.

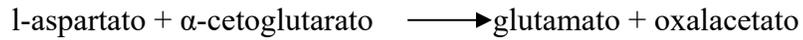
3.6 Procesamiento de las muestras

Determinación de la Aspartato Aminotransferasa (AST) y Alanino Aminotransferasa (ALT). Ensayo enzimático.

Las transaminasas AST y ALT son enzimas ampliamente difundidas en el organismo con elevada concentración en corazón, hígado, músculo esquelético, riñón y eritrocitos. La actividad sérica en condiciones normales es baja o nula. Un daño o enfermedad en cualquiera de estos tejidos conduce a un aumento en los niveles séricos. En hepatitis virales y otras formas de enfermedad hepática que involucren necrosis tisular, predominará la actividad sérica de ALT (abundante en tejido hepático).

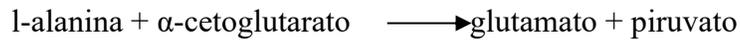
La AST cataliza la siguiente reacción:

AST



La ALT cataliza la siguiente reacción:

ALT



El piruvato formado (el oxalacetato es inestable y se transforma en piruvato), reacciona con la 2,4-dinitrofenilhidracina produciéndose, en medio alcalino, un compuesto coloreado que se mide a 505 nm.

De acuerdo con la cantidad de muestras a procesar, se rotuló un tubo como Blanco y el resto con el número de la muestra.

	Blanco	Desconocido
Reactivo A (AST o ALT)	0.5 mL	0.5 mL
Se colocó en baño de agua a 37° C ± 0,5° C unos minutos.		
Suero	-	100 uL

Agua destilada	100 uL	-
Se mezcló por agitación suave e incubó exactamente 30 minutos y se agregó		
Reactivo B	0.5 mL	0.5 mL
Se mezcló y dejó 10 minutos a 37° C. Luego se agregó:		
Reactivo C diluido	5 mL	5 mL
Se mezcló por inversión y retiró del baño. Después de 2 minutos se leyó la absorbancia en espectrofotómetro a 505 nm, llevando el aparato a cero D.O. con agua destilada		

Determinación de Bilirrubina total y fraccionada. Ensayo enzimático.

La bilirrubina, compuesto de degradación de la hemoglobina, es captada por el hígado para su conjugación y excreción en la bilis. Las alteraciones hepatocelulares u obstrucciones biliares pueden provocar hiperbilirrubinemias.

La bilirrubina reacciona específicamente con el ácido sulfanílico diazotado produciendo un pigmento color rojo-violáceo (azobilirrubina) que se mide fotocolorimétricamente a 530 nm. Si bien la bilirrubina conjugada (directa) reacciona directamente con el diazorreactivo, la bilirrubina no conjugada (indirecta) requiere la

presencia de un desarrollador acuoso (Reactivo A) que posibilite su reacción. De forma tal que, para que reaccione la bilirrubina total (conjugada y no conjugada) presente en la muestra, debe agregarse benzoato de cafeína al medio de reacción.

En tres tubos marcados como Blanco. Directa y Total, se colocó:

	Blanco	Directa	Total
Muestra (suero)	200 uL	200 uL	200 uL
Agua destilada	2.5 mL	2.5 mL	-
Reactivo A	-	-	2.5 mL
Reactivo B	200 uL	-	-
Diazorreactivo	-	200 uL	200 uL

Se mezcló de inmediato cada tubo por inversión. Luego de 5 minutos, se leyó en espectrofotómetro a 530 nm, llevando el aparato a cero con agua destilada. Las lecturas se efectuaron entre 4 y 15 minutos, excepto la bilirrubina directa que leyó a los 5 minutos exactos.

Determinación de Fosfatasa alcalina. Ensayo enzimático

La fosfatasa alcalina es una enzima ampliamente distribuida en el organismo. Hidroliza los monoésteres del ácido ortofosfórico en medio alcalino. En el adulto

proviene en parte del hígado (fracción termoestable) y en parte del hueso, sistema reticuloendotelial y vascular (fracción termolábil), dando lugar a distintas isoenzimas.

La fosfatasa alcalina desdobla al fenilfosfato de sodio en medio alcalino tamponado con aminometil propanol (AMP). El fenol liberado se determina por reacción con 4-amino-antipirina y ferricianuro como agente oxidante. El color desarrollado es directamente proporcional a la actividad enzimática y se mide a 520 nm. En tres tubos de fotocolorímetro marcados Blanco, Standard y Desconocido se colocó:

	Blanco	Estándar	Desconocido
Sustrato	0.5 mL	0.5 mL	0.5mL
Se preincubó en baño de agua a 37° C unos minutos. Luego se agregó:			
	-	-	50uL
Estándar	-	50 uL	-
Se mezcló e incubó exactamente 10 minutos (cronómetro) y luego se agregó:			
Reactivo de Color	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL
Se mezcló de inmediato cada tubo. Se retiraron los tubos del baño y se leyó en espectrofotómetro a 520 nm, llevando el aparato a cero de absorbancia con agua destilada.			

Determinación de los Valores de Referencias

Para determinar el nivel de lesión producida por Tenofovir solo y asociado a Emtricitabina, se utilizaron los valores de transaminasas, bilirrubina total y fraccionada y fosfatasa alcalina obtenidos en el grupo control como valor de referencia y los del día 0 en el grupo agudo y crónico como valor basal (Aithal y cols, 2011).

Técnicas Histológicas

Se utilizó la técnica de inclusión en parafina (Montuenga, 2009), y se procedió a la realización de los cortes con un micrótomo de 5 micras de espesor.

Posteriormente se realizó lo siguiente:

1. Se fijaron las muestras en formol-buffer al 10%, para interrumpir los procesos dinámicos celulares, mantener la estructura con la menor variación posible.
2. Se deshidrató con concentraciones crecientes de alcohol isopropílico, para eliminar el líquido presente en el tejido y facilitar la inclusión en parafina.

3. Se sometió en Xilol, para lograr la aclaración celular.
4. Se infiltraron con parafina fundida a 56°C, para disolver la aclaración y permitir la incorporación de la parafina.
5. Se incluyeron en parafina, utilizada para la formación de un bloque sólido que permitió realizar los cortes correspondientes.
6. Se realizaron cortes micrométricos 5µm para finalizar con el montaje sobre laminas portaobjetos, los cuales fueron desparafinados con xilol y luego rehidratados con las concentraciones decrecientes de alcohol etílico.
7. Se realizó la coloración.

Se realizaron 3 cortes por hígado de rata, una para la coloración con Hematoxilina – Eosina, otra para el Tricrómico de Gomori y otra como respaldo.

La coloración de Hematoxilina – Eosina, la cual se fundamenta en colorear diferencialmente los componentes del tejido, donde el núcleo se colorea con una básica (hematoxilina) y luego se colorea el citoplasma con un colorante ácido (eosina), observándose los núcleos de color azul – violeta, mientras que todas las estructuras del citoplasma toman una coloración rosada. Se sigue la técnica descrita a continuación:

- Se coloreó con hematoxilina durante 5 minutos.
- Se coloreó con eosina durante 15 segundos.

- Se deshidrató, aclarar, y colocar lámina cubreobjeto.

La Coloración Tricrómico de Gomori, se fundamenta en el estudio de las fibras colágenas, las cuales se observan de color verde por su afinidad a colorantes ácidos citoplasmáticos (verde-azul), por otro lado, los núcleos se colorean con una sustancia básica como la hematoxilina de Wiegert, y para crear contraste de emplea un cromotropo, que actúa sobre los citoplasmas celulares. A continuación, se describe la técnica:

- Se coloreó con hematoxilina de Wiegert, por 5 min.
- Se lavó con agua destilada
- Se diferenció con alcohol ácido al 10% por 10 seg.
- Se colocó con agua destilada
- Luego, se coloreó con solución de Gomori por 30min
- Se lavó con ácido acético al 2%
- Se lavó con alcohol al 95%
- Se pasó por alcohol absoluto
- Y finalmente, se pasó por xilol
- Se colocó en el medio de montaje y se cubrió con una lámina cubreobjeto.

Determinación de micronúcleos en hepatocitos

Se utilizó la técnica de micronúcleos en hepatocitos por dosis repetidas usando ratas adultas jóvenes para potenciar la detección de carcinógenos hepáticos (Matsumoto, 2014; Uno, 2014).

El fragmento de hígado conservado en formol-buffer al 10%, se depositó en un mortero estéril con 5 mL de suero bovino fetal y con ayuda de una malla metálica se procedió a la maceración. Una vez macerado se centrifugó el líquido a 1 000 r.p.m. durante 10 minutos y tras eliminar el sobrenadante se realizó un frotis del botón celular en láminas portaobjetos. Después de montadas las láminas, se esperó 24 horas a temperatura ambiente para su secado y posterior fijación en metanol absoluto durante 5 minutos, para luego realizar la tinción con Giemsa al 5 % durante 12-15 minutos (Narubi, 2012; Matheus, 2014).

El análisis se realizó observando las láminas utilizando un microscopio óptico marca Nikon ubicado en el CIMBUC, con lente de inmersión (100X). Se calculó el % de eritrocitos policromáticos (EP) portadores de micronúcleos (MN) en 2000 EP/hígado (MN-EP %), como índice de genotoxicidad. Posteriormente se calculó el índice de citotoxicidad dado por la relación de EP entre eritrocitos normocromáticos (EN) de la población total de eritrocitos (EP/EN), el % de EP en 2 000 células totales,

total de MN y el número de EP con 1 MN, 2 MN y >2 MN en cada grupo para determinar el grado de genotoxicidad (Arencibia, 2011).

3.7 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en la investigación se presentaron como medianas, valores absolutos y porcentajes, tabulados y se analizó con un software libre Past versión 2.0, utilizando medidas de tendencia central, medidas de dispersión, pruebas de independencia para comparar, Test de Friedman y Wilcoxon, Test de Kruskal Wallis y U de Mann Whitney y coeficiente de Spearman para establecer la relación entre las variables. Se empleó un nivel de confianza de 95%.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

Culminado el período experimental de tratamiento antirretroviral en ratas con la finalidad de evaluar la toxicidad hepática inducida por tenofovir solo y asociado a emtricitabina, se obtuvo los siguientes resultados:

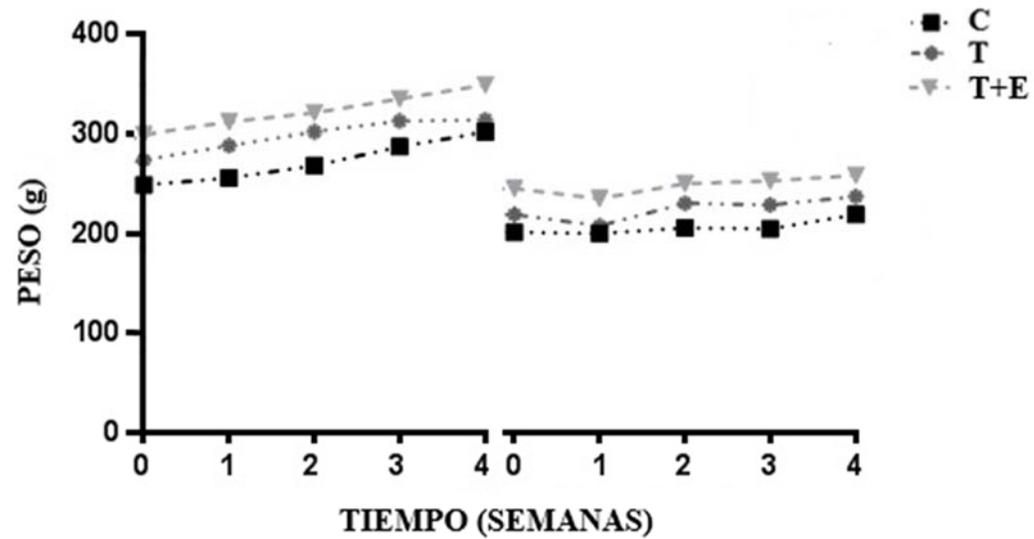
4.1 Peso

En el grupo agudo, las ratas machos (1a) y hembras (1b) tuvieron un aumento progresivo de peso según su edad y sexo durante el periodo experimental. No obstante, en las ratas hembras se observó un descenso del peso en los grupos tenofovir y tenofovir + emtricitabina en la semana 1, pero estos cambios no fueron significativos (Grafico 1).

En el grupo crónico, la mayoría de los animales de experimentación machos (2a) y hembras (2b) tuvieron un aumento progresivo de peso para su edad y sexo durante el periodo experimental, sin diferencias estadísticamente significativas (Grafico 2).

Gráfico 1

Promedios de peso del Grupo Agudo durante el período experimental



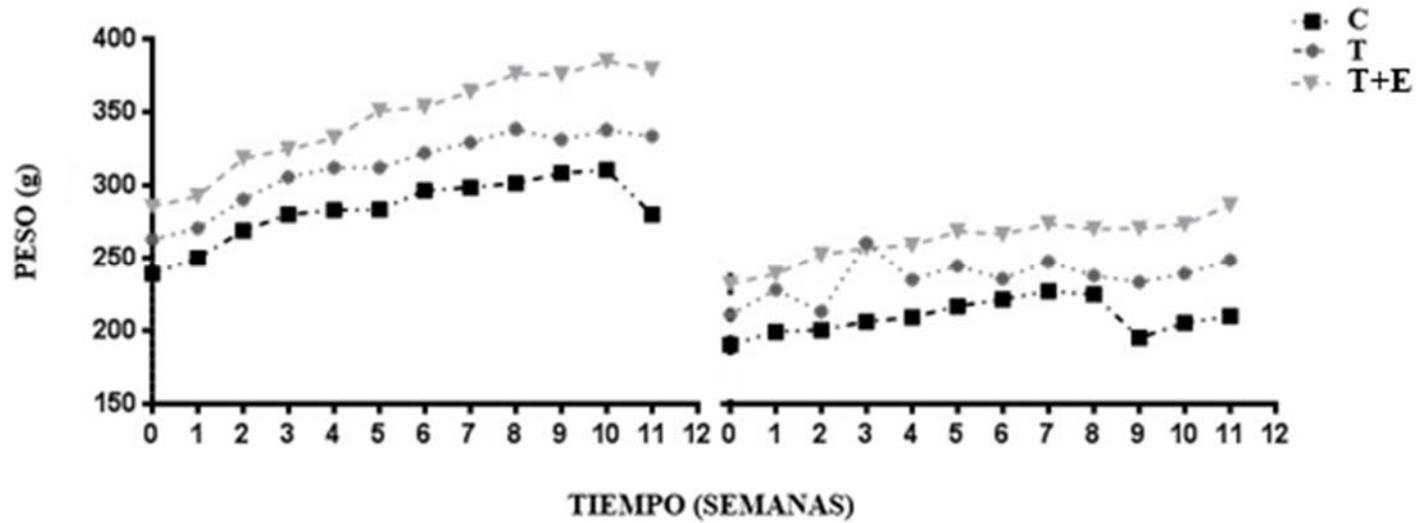
Ratas Machos (1a)

Ratas Hembras (1b)

C: Control; T: Tenofovir; T+E: Asociación Tenofovir + Emtricitabina

Gráfico 2

Promedios de peso del Grupo Crónico durante el período experimental



Ratas Machos (2a)

Ratas Hembras (2b)

C: Control; T: Tenofovir; T+E: Asociación Tenofovir + Emtricitabina

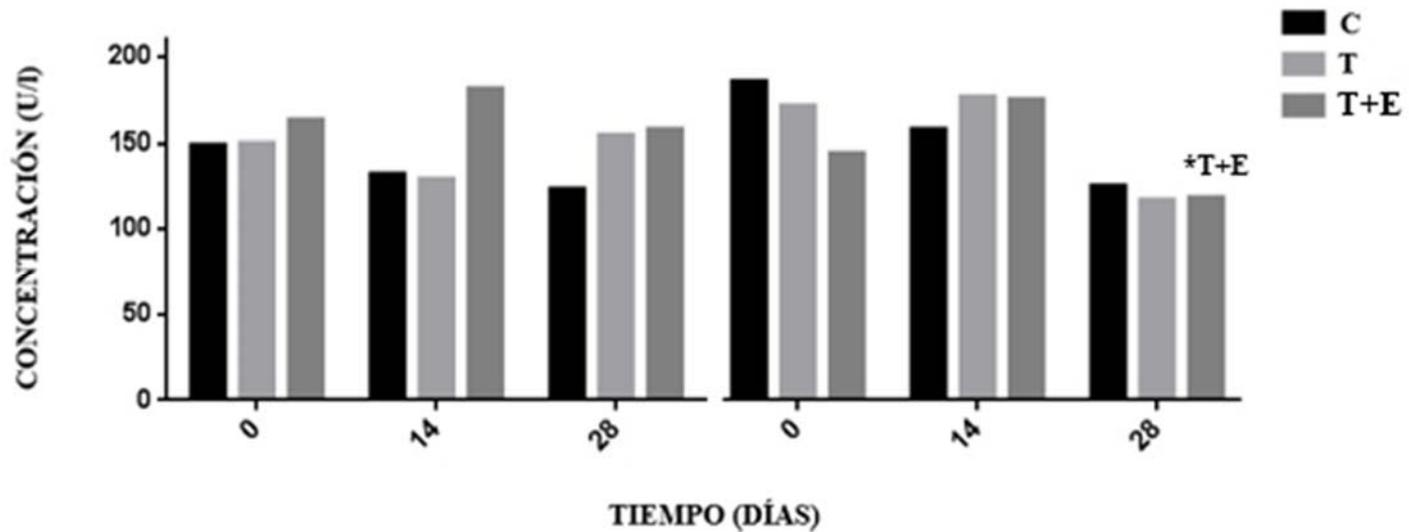
4.2 Transaminasas

En el gráfico 3 se observa que los valores de AST en las ratas machos (3a) y hembras (3b) del grupo agudo tenofovir + emtricitabina mostraron una tendencia al aumento de sus valores el día 14 con descenso para el día 28; este descenso fue estadísticamente significativo con respecto al día 14, para el grupo 3b.

El gráfico 4 muestra que en los valores de AST de las ratas machos de grupo crónico (4a) hubo una disminución significativa ($p < 0,05$) en el grupo tenofovir los días 14, 28, 60 y 90 con respecto a su valor basal y en el grupo tenofovir + emtricitabina los días 28, 60 y 90 con respecto a su valor basal. En cuanto las ratas hembras (4b), presentaron un descenso de sus valores en el grupo tenofovir + emtricitabina los días 60 y 90. Al analizar estadísticamente los resultados se observaron diferencias significativas los días 60 y 90 con respecto al día 0 y del día 90 con respecto al día 60.

Gráfico 3

Valores de Aspartato Aminotransferasa (AST) del Grupo Agudo durante el período experimental



Ratas Machos (3a)

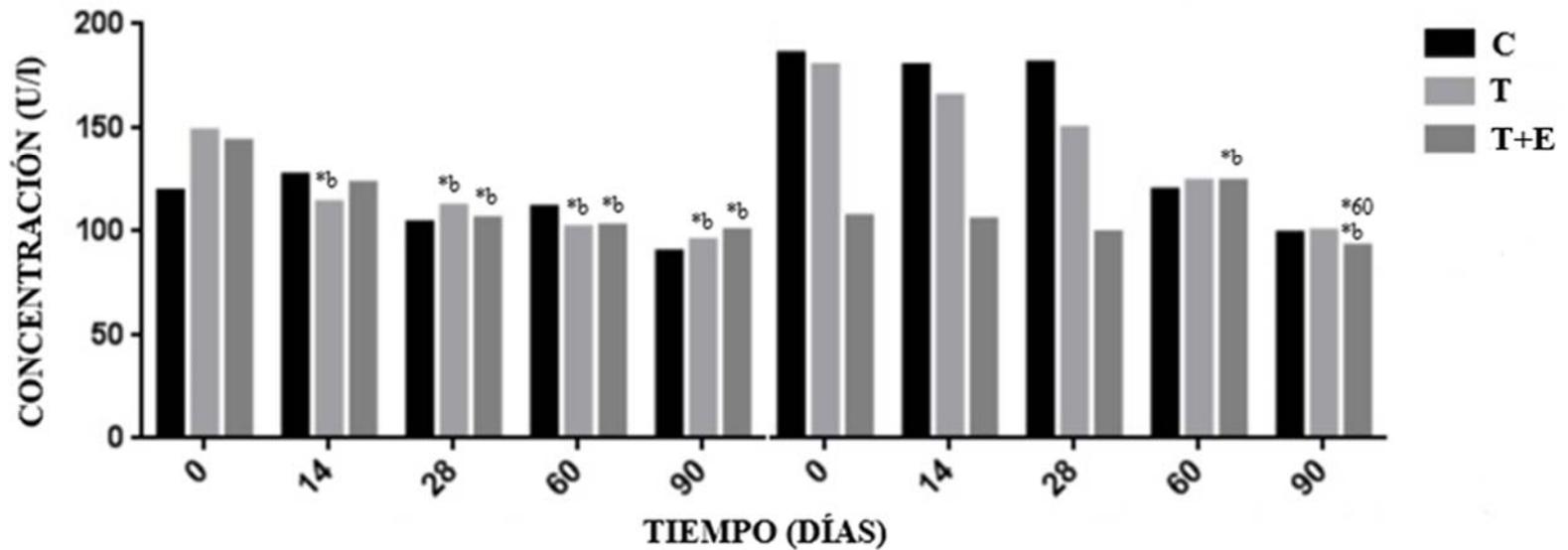
Ratas Hembras (3b)

C: Control; T: Tenofovir; T+E: Asociación Tenofovir + Emtricitabina

*T+E: $p < 0,05$ con respecto al día 14. Friedman / Wilcoxon

Gráfico 4

Valores de Aspartato Aminotransferasa (AST) del Grupo Crónico durante el período experimental



Ratas Machos (4a)

Ratas Hembras (4b)

C: Control; T: Tenofovir; E+T: Asociación Tenofovir + Emtricitabina

*b: $p < 0,05$ con respecto a la basal. Friedman / Wilcoxon

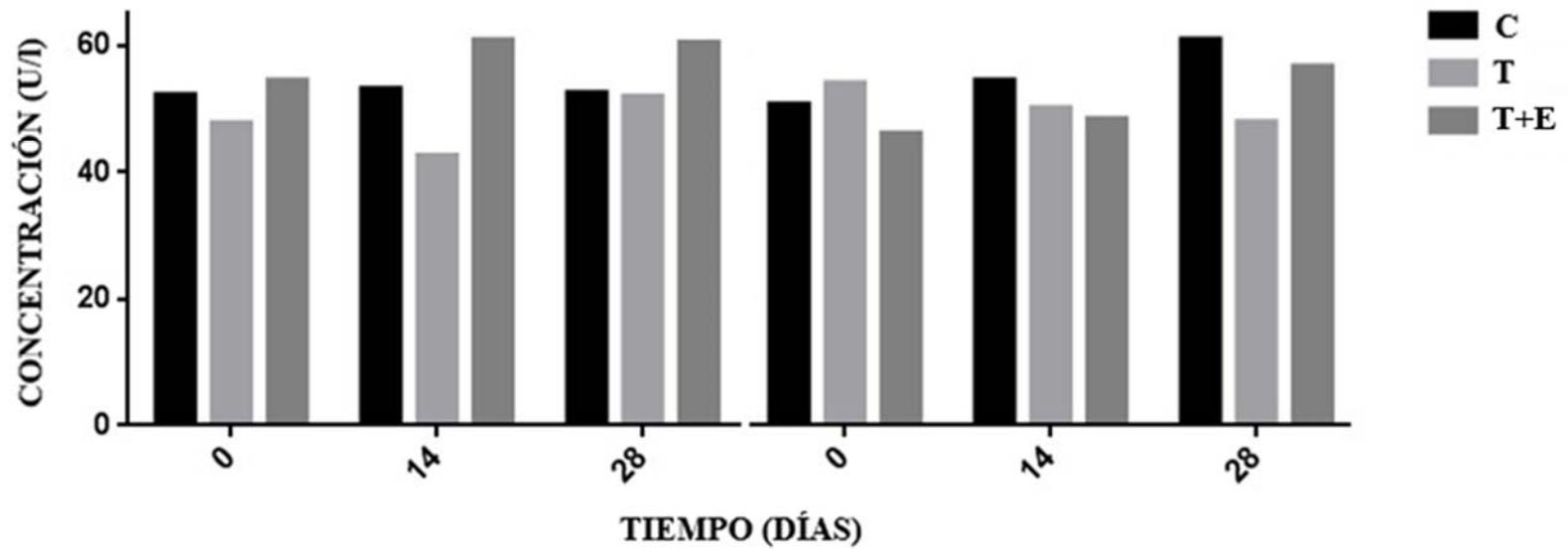
*60: $p < 0,05$ con respecto al día 60. Friedman / Wilcoxon

En el gráfico 5 se muestran los valores de ALT del grupo agudo, observándose que las ratas machos (5a) y hembras (5b) presentaron valores similares a sus basales y al grupo control durante todo el periodo experimental, sin diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

En el grafico 6 se muestran los valores de ALT del grupo crónico, observándose en las ratas machos (6a) del grupo tenofovir una disminución de los valores de ALT el día 60 que se acentuó para el día 90. El análisis de estos resultados mostró significación estadística de los valores del día 60 con respecto a lo obtenidos los días 14 y 28; así como los del día 90 con respecto a los valores obtenidos los días 0, 14, 28 y 60. El grupo tenofovir + emtricitabina mostró disminución de los valores de ALT el día 28 con aumento el día 60 y descenso para el día 90. Al analizar estadísticamente los resultados se observó aumento estadísticamente significativo de los valores de ALT con respecto al grupo tenofovir + emtricitabina el día 60 y disminución significativa el día 90 con respecto a los días 0, 14 y 60. En cuanto a las ratas hembras (6b), se presentó un aumento estadísticamente significativo ($p < 0,05$) de los valores de ALT en los grupos tenofovir y tenofovir + emtricitabina el día 60 con respecto al día 14 y una disminución estadísticamente significativa de los valores de ALT de tenofovir y tenofovir + emtricitabina del día 90 con respecto al día 60 ($p < 0,05$).

Gráfico 5

Valores de Alanino Aminotransferasa (ALT) en el Grupo Agudo durante el período experimental



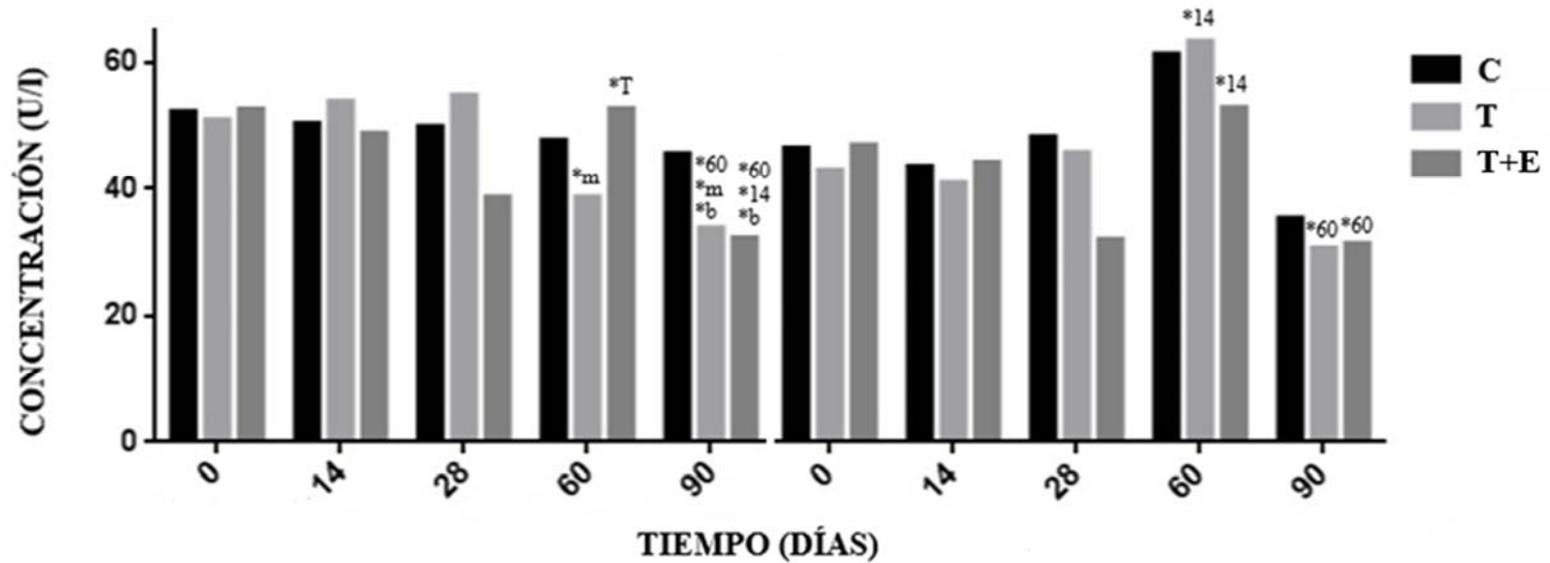
Ratas Machos (5a)

Ratas Hembras (5b)

C: Control; T: Tenofovir; E+T: Asociación Tenofovir + Emtricitabina

Gráfico 6

Valores de Alanino Aminotransferasa (ALT) Grupo Crónico durante el período experimental



Ratas Machos (6a)

Ratas Hembras (6b)

C: Control; T: Tenofovir; E+T: Asociación Tenofovir + Emtricitabina

*b: $p < 0,05$ con respecto a la basal. Friedman / Wilcoxon

*m: $p < 0,05$ con respecto al día 14 y 28. Friedman / Wilcoxon

*14: $p < 0,05$ con respecto al día 14. Friedman / Wilcoxon

*60: $p < 0,05$ con respecto al día 60. Friedman / Wilcoxon

*T: $p < 0,05$ con respecto al grupo Tenofovir día 60. Kruskal-Wallis / U de Mann Whitney

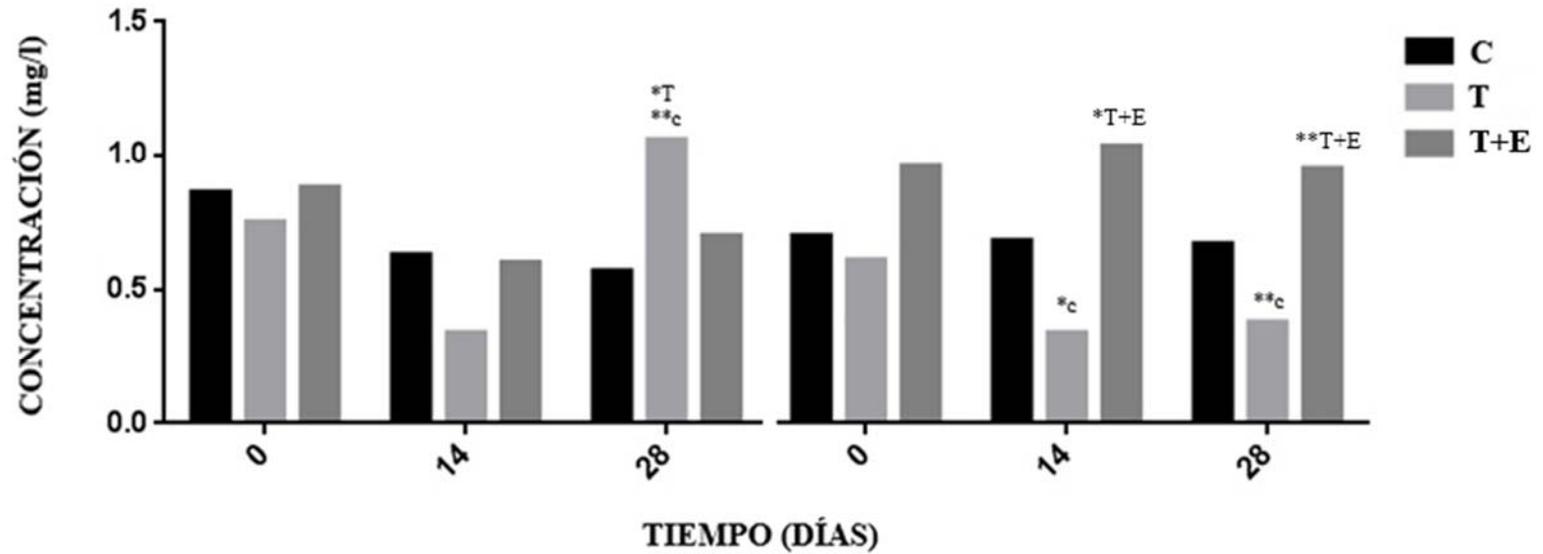
4.3 Bilirrubina

En el gráfico 7 se muestra que en el grupo Agudo los valores de bilirrubina total de las ratas machos (7a) presentaron un aumento estadísticamente significativo en el grupo tenofovir el día 28 con respecto a los valores de tenofovir del día 14 y del control del día 28. En las ratas hembras (7b), se observó una disminución estadísticamente significativa de los valores de bilirrubina total en el grupo tenofovir con respecto al control tanto en el día 14 como en el día 28. Adicionalmente, se observa un aumento estadísticamente significativo de los valores de tenofovir + emtricitabina con los valores de Tenofovir obtenidos en los días 14 y 28 de estudio.

En el gráfico 8 se observa en los valores de bilirrubina total de las ratas macho (8a) una disminución estadísticamente significativa en el grupo tenofovir + emtricitabina del día 90 con respecto al día 14. Las ratas hembras (8b), también presentaron una disminución estadísticamente significativa de los valores de bilirrubina total en el grupo tenofovir + emtricitabina de los días 14, 28, 60 y 90 con respecto al día 0.

Gráfico 7

Valores de Bilirrubina Total del Grupo Agudo durante el período experimental



Ratas Machos (7a)

Ratas Hembras (7b)

C: Control; T: Tenofovir; E+T: Asociación Tenofovir + Emtricitabina

*c: $p < 0,05$ con respecto al control (Día 14). Friedman / Wilcoxon

*T+E: $p < 0,01$ con respecto a T (Día 14). Friedman / Wilcoxon

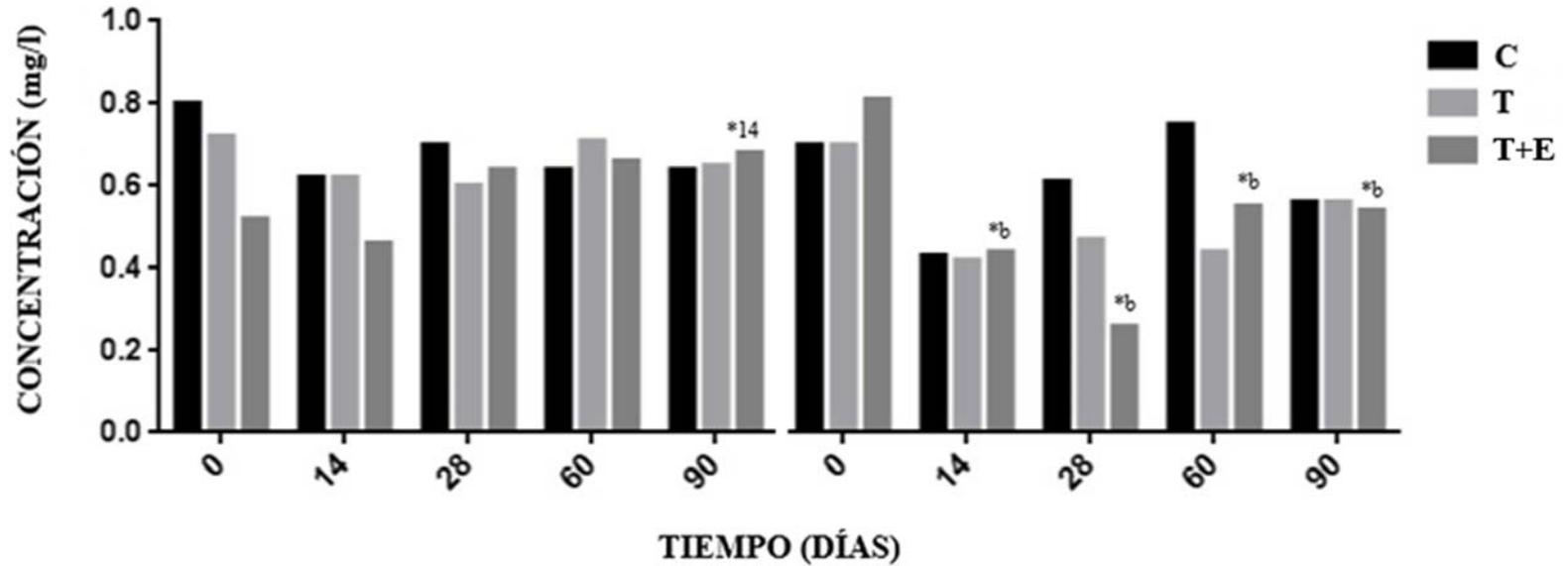
**c: $p < 0,05$ con respecto al control (Día 28). Friedman / Wilcoxon

**T+E: $p < 0,01$ con respecto a T (Día 28). Friedman / Wilcoxon

*T: $p < 0,05$ con respecto al día 14. Kruskal-Wallis / Wilcoxon

Gráfico 8

Valores de Bilirrubina Total del Grupo Crónico durante el período experimental



Ratas Machos (8a)

Ratas Hembras (8b)

C: Control; T: Tenofovir; E+T: Asociación Tenofovir + Emtricitabina

*b: $p < 0,05$ con respecto a la basal. Friedman / Wilcoxon

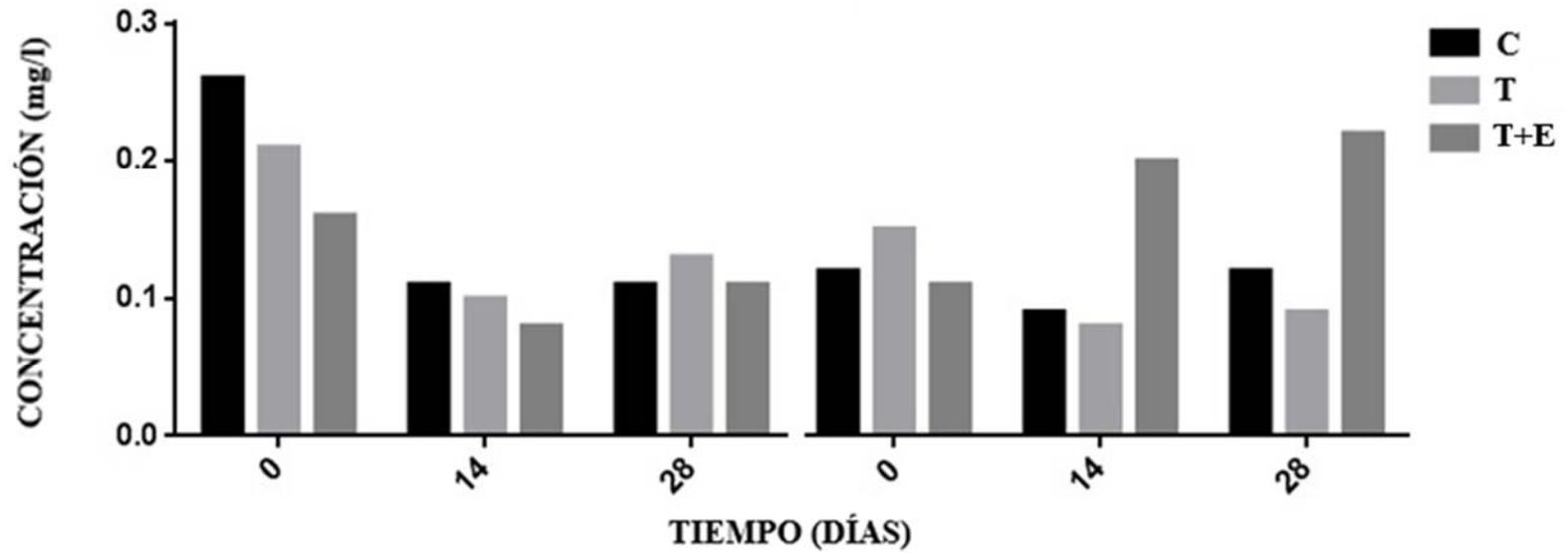
*14: $p < 0,05$ con respecto al día 14. Friedman / Wilcoxon

En el gráfico 9 se muestran los valores de bilirrubina directa de las ratas hembras (9b) del grupo Agudo, observándose un aumento de estos en el grupo tenofovir + emtricitabina los días 14 y 28, sin embargo, este aumento no fue estadísticamente significativo. Las ratas machos (9a) no presentaron diferencias estadísticamente significativas de los valores de bilirrubina directa entre los grupos.

En el gráfico 10 se observa que las ratas machos del grupo crónico (10a) mostraron un aumento estadísticamente significativo de los valores de bilirrubina directa en el grupo tenofovir el día 28 con respecto al día 14 y de tenofovir + emtricitabina del día 60 con respecto al basal y del día 90 con respecto al día 60. En contraste, los valores de bilirrubina directa de las ratas hembras (10b), no presentaron cambios estadísticamente significativos.

Gráfico 9

Valores de Bilirrubina Directa del Grupo Agudo durante el período experimental



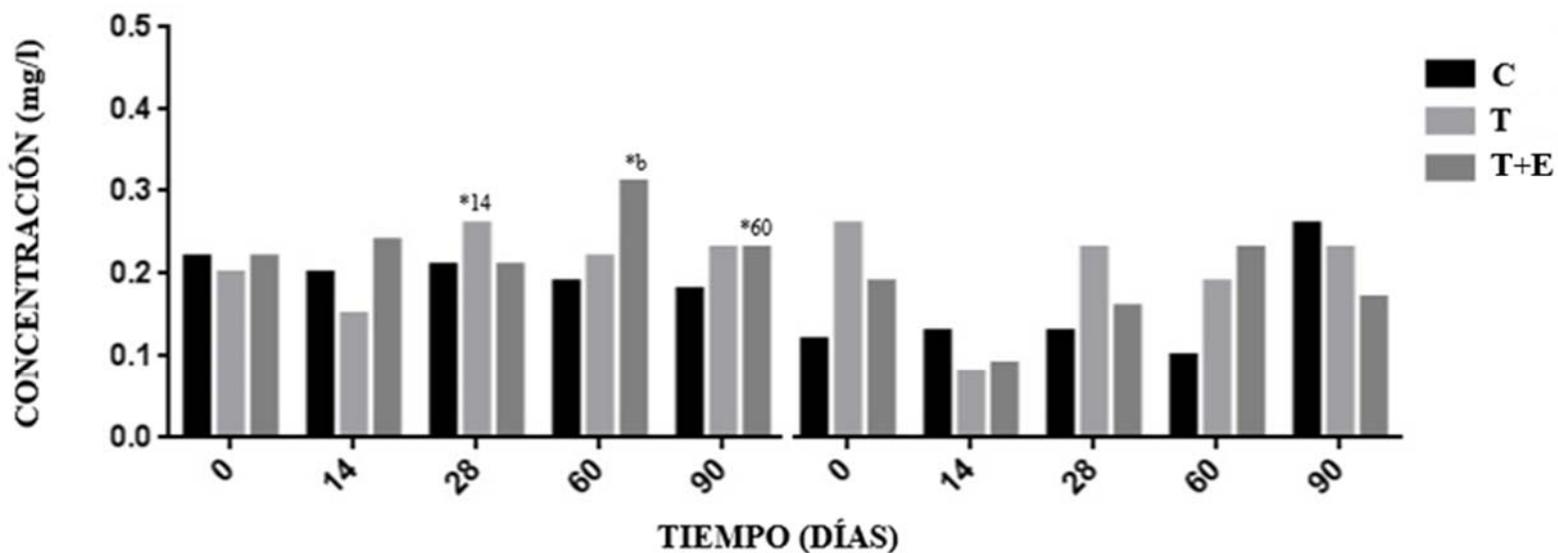
Ratas Machos (9a)

Ratas Hembras (9b)

C: Control; T: Tenofovir; E+T: Asociación Tenofovir + Emtricitabina

Gráfico 10

Valores de Bilirrubina Directa del Grupo Crónico durante el período experimental



Ratas Machos (10a)

Ratas Hembras (10b)

C: Control; T: Tenofovir; E+T: Asociación Tenofovir + Emtricitabina

*b: $p < 0,05$ con respecto a la basal. Friedman / Wilcoxon

*14: $p < 0,05$ con respecto al día 14. Friedman / Wilcoxon

*60: $p < 0,05$ con respecto al día 60. Friedman / Wilcoxon

4.4 Fosfatasa alcalina

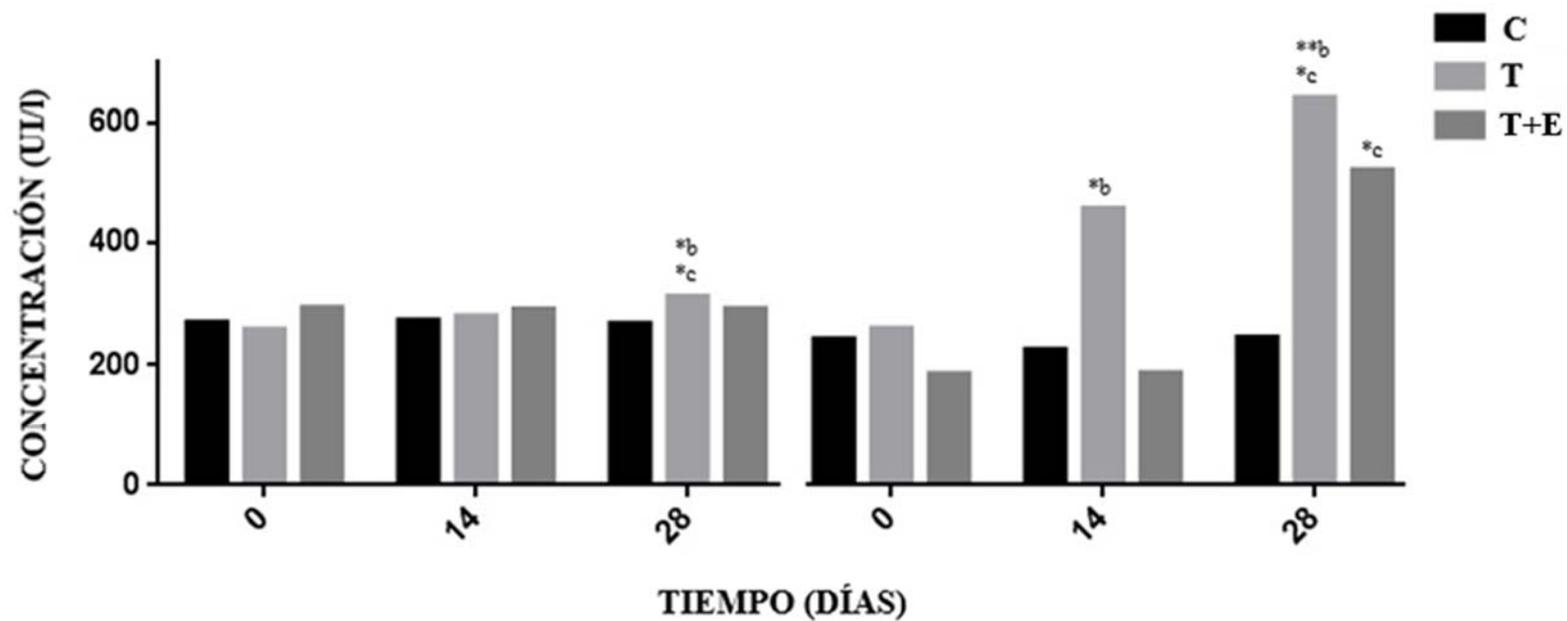
En el gráfico 11 se observa que los valores de fosfatasa alcalina de las ratas machos (11a) presentaron un aumento estadísticamente significativo en los valores fosfatasa alcalina de tenofovir del día 28 con respecto a los valores de tenofovir basal y los valores del control del día 28. En las ratas hembras (11b) del grupo agudo, se observó un aumento estadísticamente significativo en sus valores en el grupo tenofovir los días 14 y 28 con respecto a su basal. También se encontró un aumento estadísticamente significativo de los valores de tenofovir y tenofovir + emtricitabina del día 28 con respecto al valor del control de ese mismo día.

En el gráfico 12 se muestran que los valores de fosfatasa alcalina de las ratas machos (12a) del grupo crónico, presentaron un aumento estadísticamente significativo en los valores de tenofovir de los días 14, 28 y 60 y de tenofovir + emtricitabina de los días 60 y 90 con respecto a sus valores basales, así como los valores obtenidos el día 28 de tenofovir y tenofovir + emtricitabina con el control de ese día, y, los valores de fosfatasa alcalina de tenofovir + emtricitabina del día 60 con respecto a los de tenofovir y el control del mismo día. También se puede observar una disminución estadísticamente significativa de los valores de tenofovir de los días 60 y 90 con respecto a los días 14 y 28.

El grupo de las ratas hembra (12b), presentó un aumento estadísticamente significativo de los valores de tenofovir del día 28 y de tenofovir + emtricitabina de los días 14, 28,60 y 90 con respecto a sus respectivos valores basales, y una disminución estadísticamente significativa de los valores tenofovir + emtricitabina de los días 60 y 90 con respecto a los obtenidos el día 28.

Gráfico 11

Valores de Fosfatasa Alcalina del Grupo Agudo durante el período experimental



Ratas Machos (11a)

Ratas Hembras (11b)

C: Control; T: Tenofovir; E+T: Asociación Tenofovir + Emtricitabina

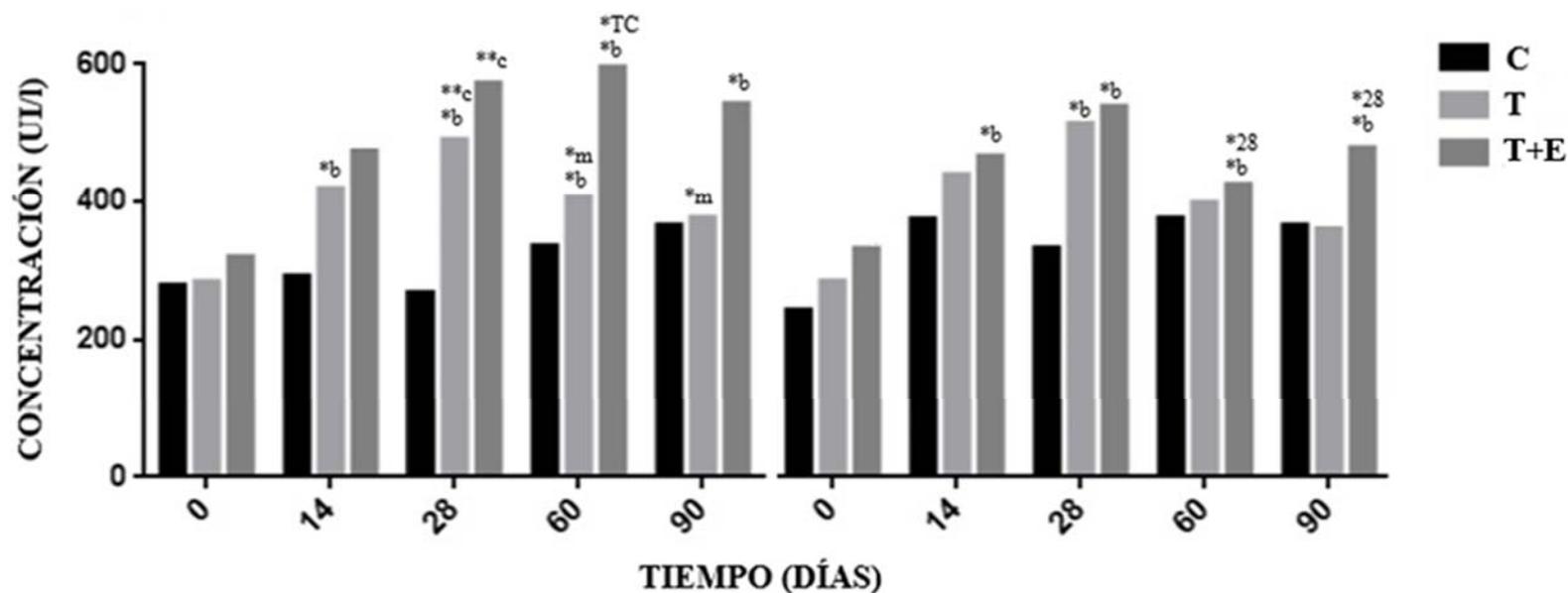
*b: $p < 0,05$ con respecto a la basal. Friedman / Wilconxon

**b: $p < 0,01$ con respecto a la basal. Friedman / Wilconxon

*c: $p < 0,05$ con respecto al control día 28. Kruskal-Wallis/U de Mann Whitney

Gráfico 12

Valores de Fosfatasa Alcalina del Grupo Crónico durante el período experimental



Ratas Machos (12a)

Ratas Hembras (12b)

*c: p<0,05 con respecto al control día 0. Kruskal-wallis /U de Mann Whitney

*T: p<0,05 con respecto al grupo Tenofovir día 0. Kruskal-wallis /U de Mann Whitney

*b: p<0,05 con respecto a la basal. Friedman / Wilcoxon

*28: p<0,05 con respecto al día 28. Friedman / Wilcoxon

C: Control; T: Tenofovir; E+T: Asociación Tenofovir + Emtricitabina

*m: p<0,05 con respecto al día 14 y 28. Friedman / Wilcoxon

**c: p<0,05 con respecto a control día 28. Kruskal-Wallis /U de Mann Whitney

*TC: p<0,05 con respecto a control y tenofovir día 60. Kruskal-wallis /U de Mann Whitney

4.5 Cambios histológicos en el tejido de las ratas:

En el estudio histológico del hígado de las ratas control, los hepatocitos de las ratas control mostraron núcleo y citoplasma de aspecto normal, las estructuras lobulillares, trabeculares y portales no presentaron alteraciones aparentes. No se observaron células necróticas ni inflamación en los lobulillos hepáticos de las láminas observadas (Tabla 1, Figura 1).

En el grupo machos tenofovir se observó dilatación sinusoidal moderada (25,0%), fibrosis centrolobulillar leve (16,7%) e infiltrado leucocitario leve (8,4%); en el grupo hembras tenofovir también se evidenció dilatación sinusoidal leve (21,45%) y moderada (14,35%) y focos de fibrosis centrolobulillar leve (14,35%). El grupo machos tenofovir + emtricitabina mostró dilatación sinusoidal leve (12%); y fibrosis centrolobulillar leve (12%). En el grupo hembras tenofovir + emtricitabina se observó dilatación sinusoidal, un 14,3% fue leve (la mitad fue difusa y la otra centrolobulillar) y un 14,3% fue moderada. Además de fibrosis centrolobulillar (14,3% leve) y fibrosis parenquimatosa (7,2% leve y 7,2% moderado) (Tabla 1, Figuras 2 y 3).

El estudio histológico de los cortes de hígado en el grupo crónico no mostró evidencia de daño celular.

Tabla 1

Alteraciones histológicas en hígado de ratas de los grupos experimentales

Hallazgos Histológicos		Grupo Agudo					
		1 GMC	2 GMT	3 GMTE	4 GHC	5 GHT	6 GHTE
Normal		100 %	49,9 %	42,7 %	100 %	49,85 %	42,7 %
Dilatación Sinusoidal	Leve			14,3 %		21,45 %	14,3 %
	Moderado		25,0 %	14,3 %		14,35 %	14,3 %
	Severo						
Fibrosis Centrolobulillar	Leve		16,7 %	14,3 %		14,35 %	14,3 %
	Moderado						
	Severo						
Fibrosis Parenquimatosa	Leve			7,2 %			7,2 %
	Moderado			7,2 %			7,2 %
	Severo						
Infiltrado Leucocitario	Leve		8,4 %				
	Moderado						
	Severo						

1: Grupo Machos Control (n=6)

4: Grupo Hembras Control (n=6)

2: Grupo Machos Tenofovir (n=6)

5: Grupo Hembras Tenofovir (n=6)

3: Grupo Machos Tenofovir + Emtricitabina

6: Grupo Hembras Tenofovir + Emtricitabina (n=6)

(n=6)

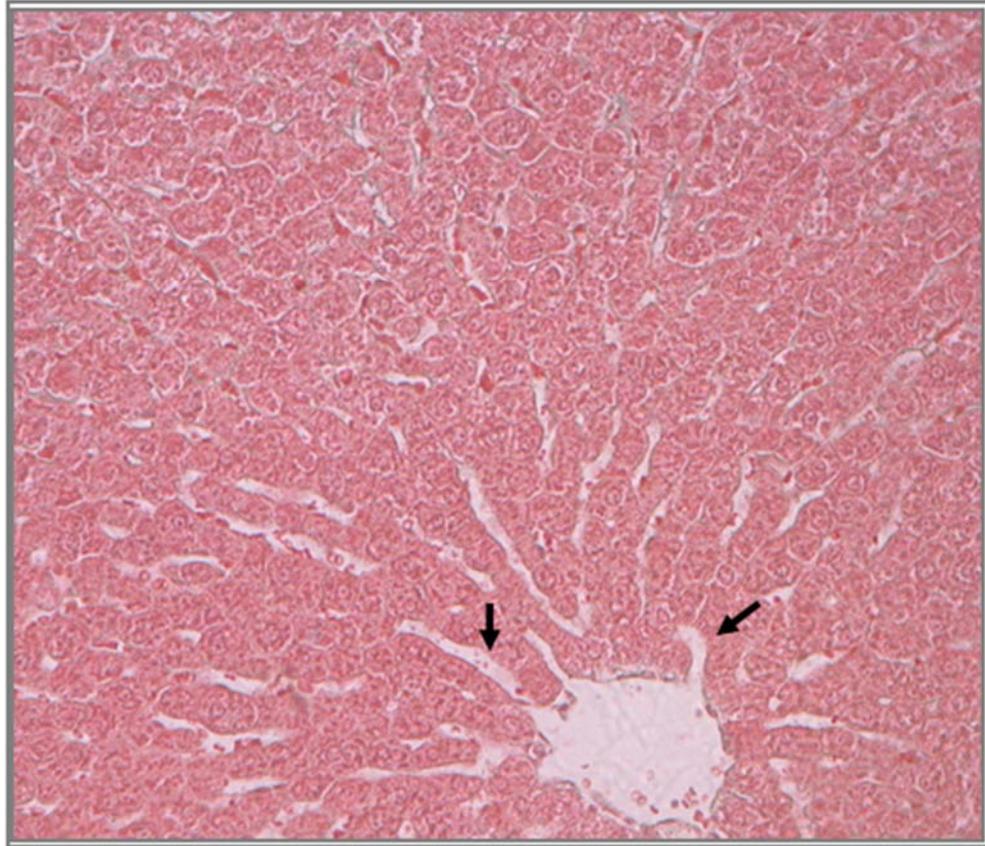


Figura 1. Hígado: HE X200. Sin evidencia de alteraciones. Existe muy leve dilatación sinusoidal peri centrolobulillar (flechas), no significativa.

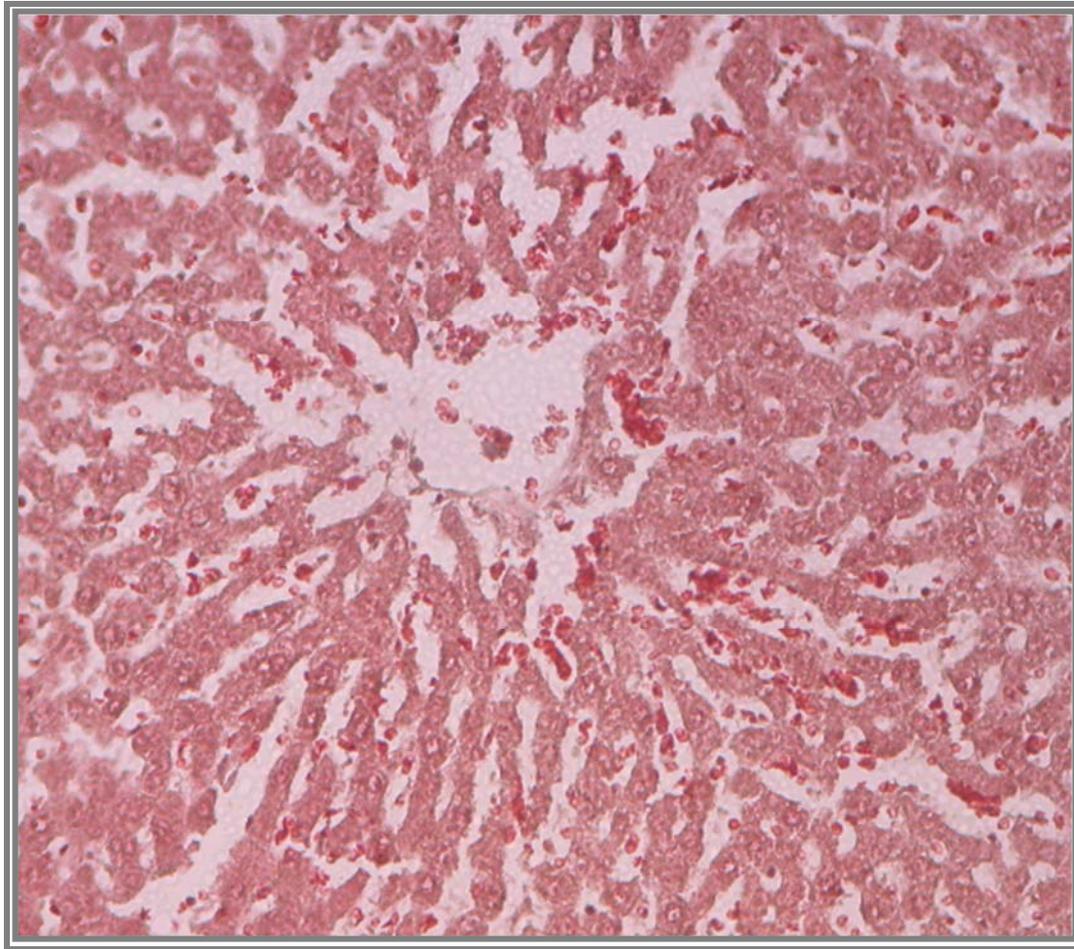


Figura 2. Hígado: TG X200. Dilatación sinusoidal moderada panlobulillar.

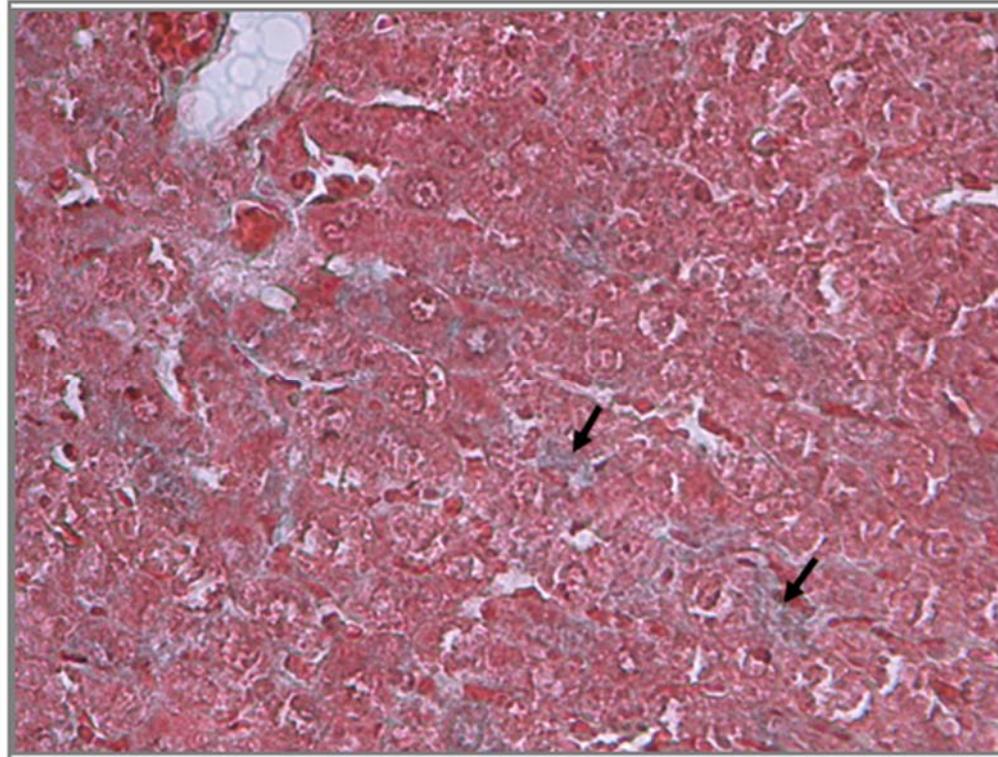


Figura 3. Hígado: TG X200. Se evidencia dilatación sinusoidal leve y fibrosis parenquimatosa leve, por la coloración verdosa del colágeno peri sinusoidal (flechas).

4.6 Micronúcleos en hepatocitos:

Fue contabilizada la presencia de eritrocitos policromatófilos (EP) (Figura 4) y normocromatófilos (EN) (Figura 4 y 5) en 2000 células/hígado, la frecuencia de EP portadores de micronúcleos para determinar el grado y se calculó el índice de citotoxicidad dado por la relación de EP/EN.

En la Tabla 2 se muestran las medianas del grupo agudo. La mediana de EP en el grupo macho control fue de 2 mientras que en tenofovir fue 2,5 y tenofovir + emtricitabina fue de 3; y las medianas de EN para el grupo control fue 93, para tenofovir fue 88 y tenofovir + emtricitabina fue 73, obteniéndose como índices de citotoxicidad: 0,02 para el grupo control, 0,025 para el grupo tenofovir y 0,045 para el grupo tenofovir + emtricitabina.

En las ratas hembras del grupo agudo (Tabla 2), la mediana de EP tanto para el grupo control como tenofovir fue de 2,5 y para tenofovir + emtricitabina fue de 7; y las medianas de EN para el grupo control fue 125, para tenofovir fue 89 y tenofovir + emtricitabina fue 65, obteniéndose como índices de citotoxicidad: 0,015 para el grupo control, 0,025 para el grupo tenofovir y 0,1 para el grupo tenofovir + emtricitabina.

En el grupo crónico presentados en la Tabla 3, la mediana de EP en el grupo macho control fue de 3,5 mientras que en tenofovir fue 2 y tenofovir + emtricitabina fue de 5; y las medianas de EN fue 99,5; 49,5 y 62,5 respectivamente. Obteniéndose como índices de citotoxicidad: 0,035 para el grupo control, 0,025 para el grupo tenofovir y 0,07 para el grupo tenofovir + emtricitabina. Por otro lado, la mediana de EP en el grupo hembra control fue de 3,5; en tenofovir fue 4 y tenofovir + emtricitabina fue de 5; y las medianas de EN fue 72; 49,5 y 61 respectivamente y sus índices de citotoxicidad fueron: 0,035 para el grupo control, 0,04 para el grupo tenofovir y 0,08 para el grupo tenofovir + emtricitabina.

Tanto en los grupos agudos y crónicos, no se observó la presencia de Micronúcleos, ni de forma espontánea o inducida en las células hepáticas de las ratas control o tratadas con tenofovir o tenofovir + emtricitabina.

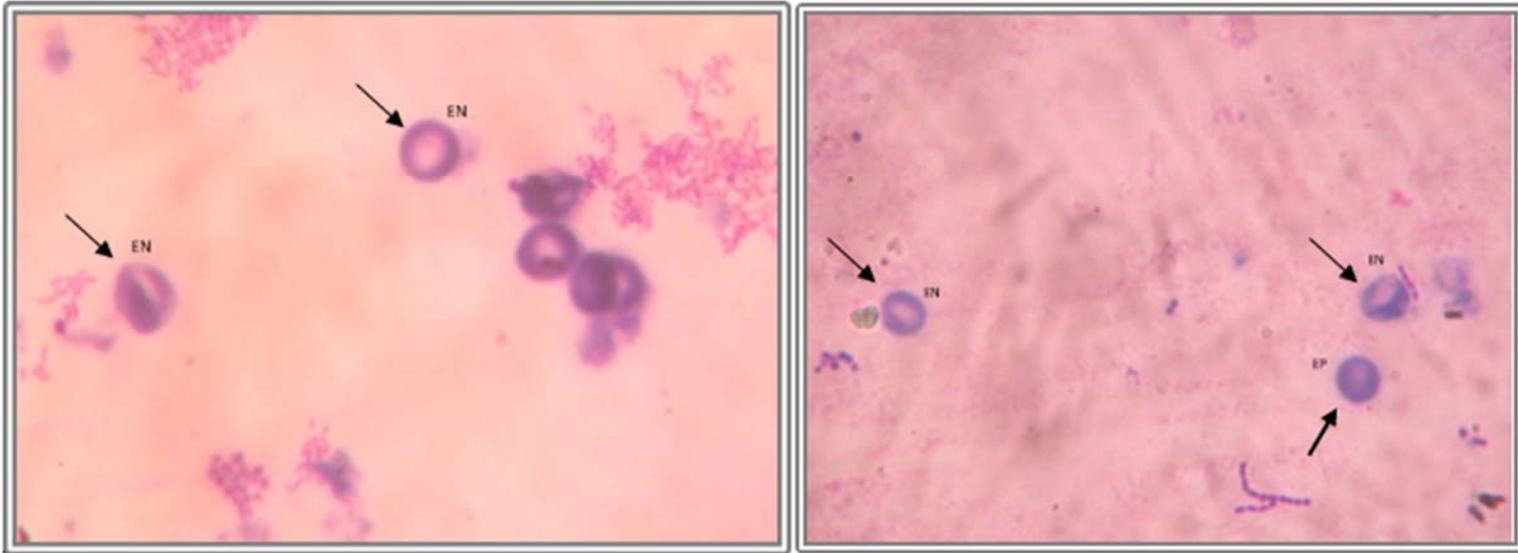


Figura 4. Hígado: Tinción con Giemsa X100. Prueba de Micronúcleos. Tipos de células: Eritrocitos Normocromatófilos (EN) y Eritrocito Policromatófilo (EP).

Tabla 2**Presencia de Micronúcleos e Índice de Citotoxicidad del Grupo Agudo**

Hallazgos	1	2	3	4	5	6
	GMC	GMT	GMTE	GHC	GHT	GHTE
N	6	6	6	6	6	5
Micronúcleos	0	0	0	0	0	0
EP	2,0	2,5	3,0	2,5	2,5	7,0
EN	96,0	88,0	73,5	125,0	89,0	65,0
Índice de Citotoxicidad	0,02	0,025	0,045	0,015	0,025	0,1

Tabla 3

Presencia de Micronúcleos e Índice de Citotoxicidad del Grupo Crónico

Hallazgos	1	2	3	4	5	6
	GMC	GMT	GMTE	GHC	GHT	GHTE
N	6	6	6	4	4	5
Micronúcleos	0	0	0	0	0	0
EP	3,5	2,0	5,0	3,5	4,0	5,0
EN	99,5	49,5	62,5	72,0	49,5	61,0
Índice de Citotoxicidad	0,035	0,025	0,07	0,035	0,04	0,08

1: Grupo Machos Control

4: Grupo Hembras Control

2: Grupo Machos Tenofovir

5: Grupo Hembras Tenofovir

3: Grupo Machos Tenofovir + Emtricitabina

6: Grupo Hembras Tenofovir + Emtricitabina

CAPÍTULO V

DISCUSION

El tratamiento antirretroviral es una estrategia cuyos objetivos principales son reducir la morbilidad asociada con la infección por VIH, lograr y mantener la supresión de la viremia hasta valores indetectables, mejorar la calidad de vida de los pacientes, prolongar su supervivencia y disminuir el riesgo de transmisión del virus (Bennett y cols, 2014; Pau, 2014). Sin embargo, el uso de estos puede incrementar el riesgo de causar daño hepático por el tiempo de exposición, el potencial intrínseco de causar hepatotoxicidad, la existencia de otras patologías que incrementan la toxicidad hepática, tales como la coinfección del virus de inmunodeficiencia humana y virus de la hepatitis C (VIH/VHC) (Alonso-Bello y col, 2018).

El paso crítico del manejo de las reacciones adversas y tóxicas causadas por los fármacos antirretrovirales en el ser humano es el reconocimiento temprano y retiro del fármaco responsable de la lesión hepática, para ello es necesaria además de la evaluación clínica, el diagnóstico histopatológico que es difícil de realizar por los riesgos inherentes al procedimiento de toma de biopsia.

Es por ello, que en el presente estudio fueron evaluados el peso, diferentes marcadores hepáticos e histológicos con la finalidad de valorar la función hepática de las ratas expuestas a tenofovir solo y asociado a emtricitabina.

Con relación al peso, se observó ganancia de este en los grupos machos y hembras durante todo el periodo experimental, sin diferencias significativas con el grupo control, lo que coincide con un estudio diseñado por Anekian y cols en el Sur de África (2018) para investigar la toxicidad de la nanopartícula de Tenofovir en el hígado y el riñón utilizando como modelo animal la rata. Estos autores no observaron pérdida de peso entre los grupos de tratamiento y control a pesar de evidenciar daño histológico hepático y renal leve.

En cuanto a los valores de transaminasas, en la ALT agudo no se observaron aumentos significativos comparados con el control, la ALT del grupo T-E crónico mostró aumento significativo el día 60 de experimentación y la AST del grupo T-E agudo presentó un aumento transitorio el día 14 con disminución en el día 28, posiblemente debido al proceso de adaptación de las ratas a la dosis administrada (Poten, 2013; Alonso – Bello y cols, 2018), la cual se ajustaba diaria e individualmente con cada rata en estudio, ya que el objetivo del estudio era observar las posibles reacciones tóxicas con la administración de dosis equivalentes (de acuerdo con el peso de las ratas) a la dosis terapéutica que se administra en humanos.

En contraste, un estudio en humanos realizado por Morse y cols en Estados Unidos (2015), evaluó a 62 adultos monoinfectados por VIH con más de 6 meses de tratamiento antirretroviral, determinando que el 65% presento un cuadro clínico hepático significativamente patológico evidenciado por la elevación crónica de las transaminasas.

En relación con la bilirrubina se observó una tendencia al aumento de sus valores en los grupos agudo y crónico, sin embargo, los mismos no fueron significativos. Aunque son escasas las evidencias en estudios animales sobre el comportamiento de este parámetro; estudios en humanos (Alonso – Bello y cols, 2018) han mostrado que en estos pueden ocurrir cambios adaptativos o tolerancia de estas sustancias o complejos que se forman por la administración de fármacos hepatotóxicos que evitan la activación de más mecanismos de daño al hígado o que en un paciente susceptible se genere la activación de los mecanismos de lesión y culmine en daño hepático (Fontana y cols, 2014).

La lesión hepática aguda inducida por fármacos se define como el incremento de la concentración sérica de la fosfatasa alcalina además de alanina-aminotransferasa o bilirrubina conjugada hasta 2 veces el límite superior del valor basal (Aithal y cols, 2011). En este sentido, en el presente estudio, los valores de fosfatasa alcalina de los animales expuestos mostraron aumentos significativos en los grupos machos y

hembras tanto agudo como crónico, lo que podría sugerir el desarrollo de enfermedad hepática por la administración de tenofovir y/o tenofovir + emtricitabina. En contraste, un estudio realizado por Aniekan y cols en el Sur de África (2018), investigó los efectos tóxicos de tenofovir y tenofovir en nanopartículas usando un modelo animal (*Sprague Dawley*), los resultados no mostraron cambios significativos en los niveles séricos de ALT, AST y fosfatasa alcalina.

Los valores observados en las pruebas hepáticas de este estudio, aunque discretos, son compatibles con los cambios histológicos en los cortes de hígado, el grupo agudo presentó mayor daño celular al ser expuesto a tenofovir asociado a emtricitabina. Entre los daños encontrados esta: dilatación sinusoidal (mayormente moderada), leve fibrosis centrolobulillar, leve fibrosis parenquimatosa, infiltrado leucocitario. Estos cambios sugieren una respuesta inflamatoria como consecuencia del daño hepático y / o extra – hepático, producto de una obstrucción o destrucción de los conductos biliares del hígado ocasionada por el Tenofovir solo y/o asociado a Emtricitabina en concordancia con Aniekan y cols (2018), los cuales evidenciaron leve daño histológico por la presencia de depósitos de colágeno y fibrosis en un estudio para investigar la toxicidad de la nanopartícula de Tenofovir en el hígado y el riñón utilizando ratas, en las cuales no se observaron cambios en las pruebas funcionales hepáticas.

En contraste, Ng y cols (2015), en una investigación con el objetivo de analizar la toxicidad, toxicocinética y toxicogenética de Tenofovir luego de 13 semanas de su administración oral en ratones, considerando como evidencia relacionada al fármaco durante la necropsia de los días 29 y 91, hepatomegalia en los animales a los que se les administro altas dosis de TDF (1000 mg/kg/día); en las dosis bajas de TDF a 50 y 500 mg/kg/día (las cuales son más elevadas a las de este estudio: 15mg/kg/día) no hubo presencia de hepatomegalia.

Es interesante destacar, que, en la presente investigación, las ratas hembra presentaron mayor alteración hepática que las ratas macho, y en su mayoría, causada por la asociación de tenofovir + emtricitabina. En concordancia un estudio retrospectivo en humanos, realizado por Wondifraw y cols (2017), para evaluar el efecto del tratamiento antirretroviral sobre las funciones renal y hepática, al tomar en cuenta el género, notaron que de los 275 pacientes infectados por el VIH que presentaron hepatotoxicidad, el género femenino predominó con 62,2%, atribuyendo este hallazgo a factores biológicos (edad, raza, hormonales). En general, los machos metabolizan los xenobióticos más rápido que las hembras, lo que contribuye a una disminución del riesgo (Repetto, 2009).

En relación con la detección de micronúcleos (MN) en los hepatocitos, es conocido que el hígado por ser un tejido involucrado en el metabolismo tiene potencial para

detectar hepatocarcinógenos y metabolitos genotóxicos (Hayashi, 2000; Hayashi, 2007; Morita, 2011). En el presente estudio, se utilizó la técnica de MN de Arencibia (2011), la cual consiste en contabilizar los eritrocitos normocromatófilos (EN), eritrocitos policromatófilos (EP) y la frecuencia de EP portadores de micronúcleos. En el análisis realizado a las muestras no se observó la presencia de MN, de forma espontánea o inducida en las células hepáticas de las ratas control o tratadas con Tenofovir o Tenofovir + Emtricitabina de los grupos agudos y crónicos. A pesar que en la revisión bibliográfica realizada no se encontraron investigaciones de detección de MN con los antirretrovirales en estudio que permitan contrastar estos resultados; un estudio realizado por Okada y col. (2019) se ha señalado que la prueba de MN en el hígado tiene una alta sensibilidad a los hepatocarcinógenos (87,5%) y también una buena especificidad para no hepatocarcinógenos (66,7%), por lo que resultados negativos con no hepatocarcinógenos como los observados en el presente estudio podría proporcionar evidencia de la especificidad de los no hepatocarcinógenos para la prueba de MN hepática. Sin embargo, para ello se requiere realizar estudios adicionales.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIÓN

En esta investigación se observó aumento transitorio de los valores de AST en animales de ambos sexos en el grupo agudo tenofovir y tenofovir asociado a emtricitabina, alteración de los valores de fosfatasa alcalina en los grupos machos y hembras tanto agudo como crónico y valores de bilirrubina con una tendencia al aumento en el grupo crónico, aunque no fueron significativos, con cambios histológicos leves y moderados en las muestras de hígado expresadas como dilatación sinusoidal, fibrosis centrolobulillar, fibrosis parenquimatosa e infiltrado leucocitario.

No se observaron pérdidas de peso significativos ni actividad genotóxica evidenciable a través de la presencia de micronúcleos en eritrocitos policromatófilos en tejido hepático; sin embargo, sugiere la necesidad de un estudio más amplio que incluya dosis mayores a las usadas en el presente estudio y compararlas con sustancias de probada actividad genotóxica y hepatocarcinógena; en los cuales además de la fosfatasa alcalina, bilirrubina, ALT y AST, determinación de la enzima gamma-glutamil transferasa, se incluya estudio histológico de los conductos biliares para evaluar una posible obstrucción de los conductos biliares del hígado ocasionada por el Tenofovir solo y/o asociado a Emtricitabina.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adaramoye, O., Adewumi, O., Adesanoye, O., Faokunla, O. & Farombi, E. (2012). Effect of tenofovir, an antiretroviral drug, on hepatic and renal functional indices of Wistar rats: protective role of vitamin E. *Journal of Basic and clinical Physiology and Pharmacology*, 23(2), 69-75.
- Alonso-Bello, C. D., Reyes-Cetina, I. L., Delgado- Cortés, H. M., Martínez-Velázquez, M. y Arroyo-Mendoza, M. E. (2018). Lesión hepática inducida por antirretrovirales. *Revista del hospital Juárez de México*, 85(1), 49-56.
- Aithal, G.P., Watkins, P.B., Andrade, R.J., Larrey, D., Molokhia, M., Takikawa H., et al. (2011). Case definition and phenotype standardization in drug-induced liver injury. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 89(6): 806-815.
- Aniakan, I., Naidu, E., Akang, E., Ogedengbe, O. O., Offor, U., Rambharose, S., et al. (2018). Investigating organ toxicity profile of Tenofovir and Tenofovir Nanoparticle on the liver and kidney: Experimental animal study. *Toxicological Research*, 34(4), 221-229.
- Arencibia, D., Rosario, L., Suárez, Y., Delgado, L. e Infante, I. (2011). Frecuencia espontánea e inducida en micronúcleos transplacentarios en ratones Balb/c. *Nova Scientia*, 3(6), 1-15.
- Aular, Y. (2018). Aspectos bioéticos del uso de animales de experimentación en la investigación científica: legislación y comité de bioética animal. *Revista Arjé*, 12(23), 94-103.
- AVMA (American Veterinary Medical Association). (1993). Report of the AVMA panel on euthanasia. *Journal American Veterinary Medical Association*, 202(2), 229-249.
- Azevedo-Pereira, J. M. & Santos-Costa, Q. (2016). HIV interaction with human host: HIV-2 as a model of a less virulent infection. *AIDS Reviews*, 18(1), 44-53.

- Bajpai, S. & Joshi, K. (2017). Hepatotocixity in HIV patients, an observational study in patients from Tertiary Care Centre of Western India. *Journal of The Association of Physicians of India*, 65(5), 47-49.
- Bejarano, J., Calderón, L., Camargo, M., Cuberos, J., Silva, I. y Valera, A. (2011). Efectos adversos de la terapia antirretroviral en pacientes menores de 15 años que acuden a la consulta de infectología pediátrica del “Hospital Universitario Ángel Larralde”, de agosto de 2008 a mayo de 2009. Disponible en <http://www.portalesmedicos.com/publicaciones/articulos/3509/1/Efectos-adversos-de-la-terapia-antirretroviral-en-pacientes-menores-de-15-anos.html>
- Bennett, J. E., Dolin, R. & Blaser, M. J. (8th Ed). (2014) Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Elsevier Inc.
- Bernal, F. (2016). Farmacología de los antirretrovirales. *Revista médica Clínica Las Condes*, 27(5), 682-697.
- Bruguera, M. (1era Ed). (2016). Guía para la interpretación de biopsia hepática. Santiago: Editorial Iku.
- Brunton, L., Chabner, B. y Knollmann, B. (12va Ed). (2012). Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. México DF: McGraw – Hill Interamericana editors, S.A.
- Cada, D., Levien, T. & Baker, D. (2014). Formulary Drug Reviews: Dolutegravir. *Hospital Pharmacy*, 49(2), 184–195.
- Cardona, G., Llibre, J. M. y Andreu, A. (2015). Profilaxis antirretroviral post-exposición al Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH). *Butlletí d'Informació Terapèutica*, 26(3), 19-26.
- Cervený, L., Neumanová, Z., Karbanová, S., Havlova, I. & Staud, F. (2015). Long-term administration of tenofovir or emtricitabine to pregnant rats; effect on

Abcb1a, Abcb1b and Abcg2 expression in the placenta and in maternal and fetal organs. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 68(1), 84-92.

Chadwick¹, D. R., Sarfo, F. S., Kirk¹, E. S. M., Owusu, D., Bedu-Addo, G., Parris, V. et. al. (2015). Tenofovir is associated with increased tubular proteinuria and asymptomatic renal tubular dysfunction in Ghana. *BMC Nephrology*, 16(195), 1-5.

Chowta, M. N., Kamath, P., Ramapuram, J. T., Shenoy, K. A. & Hadigal, S. (2018). Evaluation of adverse drug reaction profile of drugs used as first-line Antiretroviral therapy. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2018, 1-7.

Flórez, J. (5ta Ed). (2008). *Farmacología Humana*. Barcelona: Elsevier España, S.

Fontana, R.J. (2014). Pathogenesis of idiosyncratic drug-induced liver injury and clinical perspectives. *Gastroenterology*, 146(4): 914-928.

Guerra, M., Rodríguez, A., Rodríguez, S., Tovar, V., Carvajal, A., Ferreira, A., et. al. (2009). Conocimientos sobre VIH/SIDA en un grupo de embarazadas VIH(+). *Acta Odontológica Venezolana*, 47(1), 164-169.

Günthard, H. F. & Scherrer, A. U. (2016). HIV-1 Subtype C, Tenofovir, and the relationship with treatment failure and drug resistance. *The Journal of Infectious Diseases*, 214(9), 1289-1291.

Daniels, J. P. (2017). Venezuela's economic crisis hampers HIV/AIDS treatment. *The Lancet*, 389(1), 1088.

Hagio, S., Furukawa, S., Abe, M., Kuroda, Y., Hayashi, S. & Ogawa, I. (2014). Repeated doce liver micronucleus assay using adult mice with multiple genotoxicity assays concurrently performed as a combination test. *The Journal of Toxicological Science*, 39(3), 437-445.

- Hayashi, M., MacGregor, J. T., Gatehouse, D. G., Adler, I. D., Blakely, D. H., Dertinger, S. D., et. al. (2000). *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35(1), 234-252.
- Hayashi, M., MacGregor, J. T., Gatehouse, D. G., Blakely, D. H., Dertinger, S. D., Abramsson-Zetterberg, L., et. al. (2007). *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test. *Mutation Research*, 627(1), 10-30.
- Hayashi, M. (2016). The micronucleus test – most widely used *in vivo* genotoxicity test. *Genes and environment*, 38(18), 1-6.
- Hernández-Sampieri, R. & Mendoza, C. (2018). Metodología de la investigación. Las rutas cuantitativa, cualitativa y mixta, Ciudad de México, México: Editorial Mc Graw Hill Education.
- Kovari, H., Sabin, C. A., Ledergerber, B., Ryom, L., Reiss, P., Law, M., et. al. (2016). Antiretroviral drugs and risk of chronic alanine aminotransferase elevation in Human Immunodeficiency Virus (HIV) – Monoinfected persons: The data collection on adverse events on Anti-HIV drugs study. *Open Forum Infectious Diseases*. 3(1), 1-11.
- Kumar, V., Cotran, R. y Robbins, S. Patología Humana. (8va Ed). (2008) Barcelona: Elsevier España, S. L.
- Li, G. & De Clercq, E. (2016). HIV genoma-wide protein associations: a review of 30 years of research. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(3), 679-731.

- López, R (2016). Algoritmos útiles para el diagnóstico histopatológico de la enfermedad hepática con base en los patrones de daño hepático. *Revista Colombiana de Gastroenterología*, 31(4), 443-457.
- Lourenço, E., do Amaral, V., Lehmann, M., Dihl, R., Schmitt, V., Cunha, K., et. al. (2010). Micronuclei induced by reverse transcriptase inhibitors in mononucleated and binucleated cells as assessed by the cytokinesis-block micronucleus assay. *Genetics and Molecular Biology*, 33(4), 756-760.
- Lu, M., Dongb, H., Baoa, D., Liuc, B. & Liu, H. (2019). Tenofovir disoproxil fumarate induces pheochromocytoma cells apoptosis. *European Journal of Pharmacology*, 844(1), 139-144.
- Maartens, G., Celum, C. & Lewin, S. R. (2014). HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. *Lancet*, 384(9939), 258–271.
- Mandala, J., Nanda, K., Wang, M., De Baetselier, I., Deese, J., Lombaard, J. et. al. (2014). Liver and renal safety of tenofovir disoproxil fumarate in combination with emtricitabine among African women in a pre-exposure prophylaxis trial. *BMC Pharmacology and Toxicology*, 15(77), 1-7.
- Matsumoto, K., Zaizen, K., Miyamoto, A., Wako, Y., Kawasako, K. & Ishida, H. (2014). Evaluation of the repeated dose liver micronucleus assay using young adult rats with cyclophosphamide monohydrate: A report of a collaborative study by CSGMT/JEMS.MMS. *Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 90(3), 780-781.
- Matheus, T. y Bolaños, A. (2014). Micronúcleos: biomarcador de genotoxicidad en expuestos a plaguicidas. *Salus*, 18(2), 18-24.
- Montuenga, L., Esteban, F. y Calvo, A. (1era Ed). (2009). Técnicas de Histología y Biología Celular. Barcelona: Elsevier España, S. L.

- Morita, T., MacGregor, J. T. & Hayashi, M. (2011). Micronucleus assays in rodent tissues other than bone marrow. *Mutagenesis*, 26(1), 223-230.
- Morse, C. G., McLaughlin, M., Matthews, L., Proschan, M., Thomas, F., Gharib, A. M., et al. (2015). Nonalcoholic steatohepatitis and hepatic fibrosis in HIV-1-Monoinfected adults with elevated aminotransferase levels on Antiretroviral therapy. *Clinical Infectious Diseases*, 60(10), 1569-1578.
- Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA (ONUSIDA). Informe Anual 2017. Situación de la epidemia de SIDA.
- Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA (ONUSIDA). Informe Anual 2018. Situación de la epidemia de SIDA.
- Ng, H. H., Stock, H., Rausch, L., Bunin, D., Wang, A., Brill, S. et al. (2015). Tenofovir Disoproxil Fumarate: toxicity, toxicokinetics, and toxicogenomics analysis after 13 weeks of oral administration in mice. *International Journal of Toxicology*, 34(1), 4-10.
- Okada, E., Fujiishi, Y., Narumi, K., Kado, S. & Ohyama, W. (2019). Evaluation of a 28-day repeated-dose micronucleus test in rat glandular stomach, colon and liver using gastrointestinal tract-targeted genotoxic-carcinogens and non-carcinogens. *Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 844(1), 62-68.
- Pau, A. K. & George, J. M. (2014) Antiretroviral therapy: Current drugs. *Infectious Disease Clinics of North America*, 28(3), 371-402.
- Pontén, I., Mutch, P., Nicholls, D., Saad, A., Díaz, C., Young, A., et al. (2013). Micronucleus induction in the bone marrow of rats by pharmacological mechanisms. II: long-acting beta-2 agonism. *Mutagenesis*, 28(2), 233-239.

- Repetto, M. y Repetto, G. (4ta Ed). (2009). Toxicología Fundamental. Madrid: Ediciones Diaz de Santos.
- Ribera, E., Tuset, M., Martín, M y Del Cacho, E. (2011). Características de los fármacos antirretrovirales. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(5), 362–391.
- Rodríguez A. K., Garzaro, D. J., Loureiro, C. L., Gutiérrez, C. R., Ameli, G., Jaspe, R. C. et. al. (2014). HIV-1 and GBV co-infection in Venezuela. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 8(7), 863-868.
- Setkina, S., Dotsenko, M., Bondar, S., Charnysh, I., Kuchko, A., Kaznacheeva, A., et. al. (2015). Safety and Effectiveness of Highly Active Antiretroviral Therapy in Treatment-Naïve HIV Patients: Preliminary Findings of a Cohort Event Monitoring Study in Belarus. *Drug Safety*, 38(4):365-372.
- Shimada, K., Yamamoto, M., Takashima, M., Seki, J., Miyamae, Y. & Wakata, A. (2015). Prolonged rest period enables the detection of micronucleated hepatocytes in the liver of young adult rats after a single dose of diethylnitrosamine or mitomycin C. *Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 791(1), 38-41.
- Tse, W. F., Yang, W., & Huang, W. (2015). A narrative review of cost-effectiveness analysis of people living with HIV treated with HAART: from interventions to outcomes. *Clinicoeconomics and Outcomes Research: CEOR*, 7, 431-439.
- Uno, Y., Morita, T., Luijten, M., Beevers, C., Hamada, S., Itoh, S., et. al. (2014). Recommended protocols for the liver micronucleus test: Report of the IWGT working group. *Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 786(1), 13-18.
- Valade, E., Tréluyer, J., Bouazza, N., Ghosn, J., Foissac, F., Benaboud, S. et. al. (2014). Population pharmacokinetics of Emtricitabine in HIV-1-Infected adult patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(4), 2256-2261.

- Vidya, K. K., Priyadarshini, K., Tripathi, S. P. & Hanna, L. E. (2017). Pathophysiology of CD4+ T-Cell Depletion in HIV-1 and HIV-2 Infections. *Frontiers in Immunology*, 8,1-6.
- Wang, Y., Jin, Y., Chen, C., Zheng, W., Wang, S., Ungvari, G. S. et. al. (2019). Meta-analysis of adherence to highly active antiretroviral therapy in patients with HIV infection in China. *AIDS Care Psychological and Socio-medical Aspects of AIDS/HIV*, 31(8),913-922.
- Wondifraw, H., Tegene, B., Gebremichael, M., Birhane, G., Kedir, W. & Biadgo, B. (2017). Assessment of the effect of antiretroviral therapy on renal and liver functions among HIV-infected patients: retrospective study. *HIV/AIDS – Research and Palliative Care*, 9(1), 1-7.