

GISELA MARIA VIEIRA
RODRIGUES DE CARVALHO¹
MARY UCHIYAMA NAKAMURA²
RICARDO SANTOS SIMÕES³
ELIANA MARIA RESTUM ANTONIO¹
ADRIANA WAGNER¹
TEREZA MARIA PEREIRA FONTES¹
LUIZ KULAY JÚNIOR⁴

Efeitos da administração diária da associação estavudina/nelfinavir sobre os fetos e placentas da rata albina

Effects of daily administration of a stavudine/nelfinavir association on the fetuses and placentas of female albino rats

Artigo original

Palavras-chave

Estavudina
Nelfinavir
/Efeitos adversos
Anti-retrovirais
Ratos
Prenhez

Keywords

Stavudine
Nelfinavir
/Adverse effects
Anti-retroviral agents
Rats
Pregnancy, animal

Resumo

OBJETIVO: avaliar o efeito da administração da associação estavudina/nelfinavir durante toda a prenhez da rata, avaliando seu peso e dos conceptos, bem como o número de implantações, fetos, placentas, reabsorções e mortalidades materna e fetal. **MÉTODOS:** quarenta ratas albinas EPM-1 Wistar, prenhes, foram aleatoriamente divididas em quatro grupos: GCtrl (controle do veículo) e três experimentais, Expl, Expll e Explll, que receberam, respectivamente, 1/40, 3/120 e 9/360 mg/kg por dia de estavudina/nelfinavir por via oral. As drogas e o veículo (água destilada) foram administrados por gavagem em duas tomadas diárias (12/12 horas), desde o dia 0 até o 20º dia da prenhez. No último dia do experimento, todos os animais foram anestesiados e eutanasiados. Foram avaliados a evolução do peso materno no 7º, 14º e 20º dias, número de fetos, placentas, implantações, reabsorções, óbitos intrauterinos, malformações maiores e o peso dos fetos e das placentas. A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA), complementada pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). **RESULTADOS:** em relação ao peso corporal das ratas, houve ganho gradual e progressivo durante o decorrer da prenhez em todos os grupos, sendo este ganho mais evidente no período final; porém não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre eles. O número de fetos, placentas, implantações, assim como os pesos fetais e placentários também não mostraram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos analisados. Não foram observadas, também nos grupos experimentais, reabsorções e malformações fetais maiores externas, no entanto, observamos entre o 8º e o 14º dias de gestação um caso de morte materna em cada grupo experimental. **CONCLUSÕES:** a administração da associação estavudina/nelfinavir não mostrou efeitos deletérios sobre os conceptos.

Abstract

PURPOSE: to evaluate the effect of administration of a stavudine/nelfinavir combination on the rat pregnancy by assessing maternal and concepts weights, as well as the number of implantations, fetuses, placentas, resorptions and maternal and fetal mortality. **METHODS:** forty adult pregnant Wistar rats of the EPM-1 strain were randomly divided into four groups: control (GCtrl – drug vehicle control, $n = 10$), and three experimental groups, which were treated with an oral solution of stavudine/nelfinavir (Expl – 1/40 mg/kg b.w., $n = 10$; Expll – 3/120 mg/kg b.w., $n = 10$; Explll – 9/360 mg/kg b.w., $n = 10$) from day 0 to the 20th day of pregnancy. Maternal body weights were determined at the start of the experiment and on the 7th, 14th and the 20th day thereafter. At term (20th day) the rats were anesthetized and, upon laparotomy and hysterotomy, the number of implantations, resorptions, living fetuses, placentae and intrauterine deaths were recorded. The collected fetuses and placentae were weighed and the concepts were examined under a stereomicroscope for possible external malformations. Statistical analysis was performed by analysis of variance (ANOVA) complemented by the Kruskal-Wallis test ($p < 0.05$). **RESULTS:** there was a progressive and gradual increase in body weight during the course of pregnancy in all groups, which was more evident in the final period, but with no significant difference between groups. The mean number of fetuses, placentas, implantations, and fetal and placental weights showed no significant differences between groups. Also, no resorptions or external malformations were found in the experimental groups. However, between the 8th and 14th days of gestation, there was one case of maternal mortality in each experimental group. **CONCLUSIONS:** the administration of a stavudine/nelfinavir combination had no deleterious effects on the concepts.

Correspondência:

Luiz Kulay Júnior
Rua Napoleão de Barros, 715 – 8º andar – Vila Clementino
CEP: 04024-200 – São Paulo (SP), Brasil
Tel.: (55 11) 5572-2605 – Fax: (55 11) 5571-0761

Recebido

09/05/2011

Aceito com modificações

30/05/2011

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

¹ Pós-Graduanda do Departamento de Obstetrícia da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP – São Paulo (SP), Brasil.

² Professora Associada do Departamento de Obstetrícia da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP – São Paulo (SP), Brasil.

³ Pós-Graduando do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – USP – São Paulo (SP), Brasil.

⁴ Professor Titular do Departamento de Obstetrícia da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP – São Paulo (SP), Brasil.

Conflitos de interesse: não há.

Introdução

Com a facilidade de diagnóstico da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA/AIDS), do parto cesáreo programado, a suspensão do aleitamento materno e a terapia antirretroviral combinada de alta potência, denominada *highly active antiretroviral therapy* (HAART) ocorreu redução acentuada da transmissão vertical do vírus da imunodeficiência humana (HIV) aumentando muito a sobrevivência do recém-nato¹⁻³. Esta terapia compreende a associação de drogas e promove importante e sustentada supressão da replicação viral, aumentando a sobrevivência dos pacientes soropositivos e, conseqüentemente, a prevalência dessa infecção⁴. A redução da mortalidade é particularmente evidente em países industrializados de alta renda onde o acesso aos cuidados de saúde e tratamentos antirretrovirais são facilitados⁵.

Recentemente o Programa das Nações Unidas sobre HIV/AIDS da Organização Mundial da Saúde UNAIDS/OMS estimou que a epidemia global da AIDS, em 2009, atingiu cerca de 33,3 milhões de pessoas, sendo destes, 10 milhões (9 – 11 milhões) em países de média e baixa renda e que necessitavam urgentemente da terapia antirretroviral (TARV)⁶. Assim o acesso à TARV é uma “emergência de saúde global”, pois além de melhorar e prolongar a vida dos indivíduos infectados, reduz a transmissão do HIV. Neste sentido, o custo da terapia antirretroviral combinada de alta potência diminuiu devido a várias iniciativas internacionais⁷. Em vários países em desenvolvimento, o *National AIDS Control Organization* (NACO) já introduziu medicamentos baratos e genéricos, de tal maneira que um número crescente de indivíduos infectados pelo HIV estão recebendo tratamento⁸.

No entanto, deve-se salientar que estudos que avaliem a segurança desses medicamentos durante a gravidez ainda são necessários, especialmente quanto à sua toxicidade e potencial teratogênico. Dentre essas substâncias interessamo-nos pela estavudina e o nelfinavir.

A estavudina (d4T) é um medicamento que já foi considerado de primeira linha nos países em desenvolvimento. É relativamente barata e fácil de usar. É um nucleosídeo sintético análogo à timidina. Atua como agente antirretroviral que inibe a transcriptase reversa do HIV devido à competição com o substrato natural, o trifosfato de timidina. Inibe também a síntese do DNA viral devido à ausência do grupo 3'-hidroxil, que é necessário à elongação da cadeia⁹. No entanto, a Organização Mundial da Saúde (OMS), na década de 90, recomendou aos países que, gradualmente, substituíssem a estavudina por alternativas menos tóxicas e “igualmente eficazes” como a zidovudina (AZT) ou o tenofovir (TDF), pois essa droga gera distúrbios neurológicos, causando formigamento e queimação nas mãos e pés, além da distribuição

anormal de gordura corporal (lipodistrofia), sequelas que foram consideradas “incapacitantes e desfigurantes”^{1,2}. No entanto, essa substância ainda vem sendo utilizada em combinação com outros antirretrovirais nos países em desenvolvimento¹⁰.

Já o nelfinavir, um antirretroviral inibidor de protease, aprovado em 1997 para o tratamento de indivíduos infectados pelo HIV-1 e HIV-2, foi um dos mais prescritos em adultos, adolescentes e crianças com idade acima de dois anos, sendo usado nas gestações com menos de 28 semanas e com carga viral mais acentuada¹. No entanto, devido à contaminação do produto em 2008, determinou-se suspensão de sua venda, uma vez que interfere nos genes da replicação viral, alterando a estrutura de precursores das poliproteínas Gag e Gag-pol que alteram a configuração do capsídeo, levando à formação de vírus imaturos e não infectantes¹¹.

Apesar do nelfinavir estar sendo substituído pela segunda geração de inibidores de protease do HIV, que permitem melhores tratamentos em combinação com outros antirretrovirais, esta droga volta a ser foco de interesse devido a efeito paradoxal: o nelfinavir estimula a apoptose de células tumorais e a morte celular por mecanismo independente das mitocôndrias, ligado ao retículo endoplasmático, é o denominado estresse do retículo endoplasmático¹². Além disto, foram descritos efeitos antimicrobianos, incluindo eficácia contra a malária, tuberculose e síndrome respiratória aguda (SARS). Estudos clínicos com o nelfinavir referem que o mesmo poderia ser utilizado nas estratégias de tratamento do câncer, funcionando como um quimioterápico¹³.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a ação da associação estavudina/nelfinavir em ratas prenhes e sua prole, partindo da constatação da ação lesiva da estavudina e da ação protetora do nelfinavir.

Métodos

Foram utilizadas ratas albinas da linhagem EPM-1 Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) de aproximadamente 90 dias de idade, virgens, pesando aproximadamente 200g, oriundas da Central de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo/Escola Paulista de Medicina (UNIFESP/EPM), onde o experimento se desenvolveu após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) (Parecer nº 1517/06).

Foram acomodados cinco animais em cada gaiola e mantidos em biotério sob temperatura ambiente de 22°C, iluminação artificial fluorescente, com fotoperiodicidade 12/12h (7 às 19h – claro), oferta de ração balanceada para ratos e água *ad libitum*. Após período de adaptação de 15 dias, foram acasalados na proporção de um macho para

duas fêmeas, por um período de 2 horas. O diagnóstico da prenhez foi realizado pela identificação de espermatozoides na luz da vagina. O período de 24 horas logo após o acasalamento foi considerado dia 0 da prenhez¹⁴.

Em seguida, as 40 ratas prenhes foram distribuídas aleatoriamente em quatro grupos, a saber: um controle (GCtrl) tratado com água destilada; e três experimentais ExpI, ExpII e ExpIII, que receberam durante toda a prenhez, respectivamente, 1, 3 e 9 mg/kg de estavudina (d4T) (Stavudine® Bristol-Myers Squibb Canada Inc.) associado a 40, 120 e 360 mg/kg de mesilato de nelfinavir (NFV) (Viracept® Laboratório Roche). O veículo e as drogas foram administrados por gavagem, duas vezes ao dia (12/12 h), num volume final de 1,0 mL, iniciando-se no dia zero até o termo da prenhez.

Todos os animais foram pesados nos dias 0, 7º, 14º e 20º da prenhez, sendo os dados expressos em ganho percentual que foram calculados de acordo com a seguinte fórmula:

$\Delta\% = (\text{peso no dia } X - \text{peso inicial}) \times 100 / \text{peso inicial}$; onde X representa os dias da pesagem (7º, 14º e 20º).

Ao termo (20º dia), todas matrizes foram anestesiadas usando-se uma mistura de cloridrato de xilazina 20 mg/kg (Rompun®) e cloridrato de quetamina 10 mg/kg (Ketalar®), por via intraperitoneal. Sob efeito anestésico, foi realizada laparotomia xifopúbica seguida de histerotomia, sendo anotados os seguintes parâmetros: número de sítios de implantação e de reabsorção, número de placentas e de fetos vivos ou mortos, pesos das placentas e dos fetos. Em seguida, os fetos foram detalhadamente e cuidadosamente examinados sob lupa estereoscópica para detectar a presença de malformações maiores externas (encurtamento de membros, espinha bífida, fenda palatina, hipospádia e lábio leporino).

Os resultados foram inicialmente submetidos a análise de variância (ANOVA) e posteriormente analisados por comparações múltiplas pelo teste de Kruskal-Wallis. O nível de rejeição para hipótese de nulidade foi fixado em 5%.

Resultados

Comparando-se os quatro grupos estudados em relação ao ganho de peso corporal desde o início do experimento (dia 0), notou-se ganho ponderal durante todo o período de prenhez, nos vários grupos de estudo. O maior ganho ocorreu no último terço de gestação, no entanto, não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os valores registrados, embora o maior ganho de peso tenha sido observado no grupo ExpIII (Figura 1). As médias do número de fetos foram: GCtrl=11,3±2,4; ExpI=11,5±1,4; ExpII=12,0±2,1 e ExpIII=9,7±3,5. Igualmente, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes quanto ao peso das placentas – GCtrl=0,6±0,1 g; ExpI=0,6±0,1 g; ExpII=0,61±0,05 g e ExpIII=0,69±0,24 g – ou dos fetos – GCtrl=3,85±0,31 g; ExpI=4,4±0,4 g; ExpII=4,4±0,3 g e ExpIII=4,3±0,3 g. Não foram encontradas malformações fetais maiores externas. No entanto, observamos entre o 8º e o 14º dias da gestação um caso de mortalidade materna em cada grupo experimental e uma morte fetal no ExpI (Tabela 1).

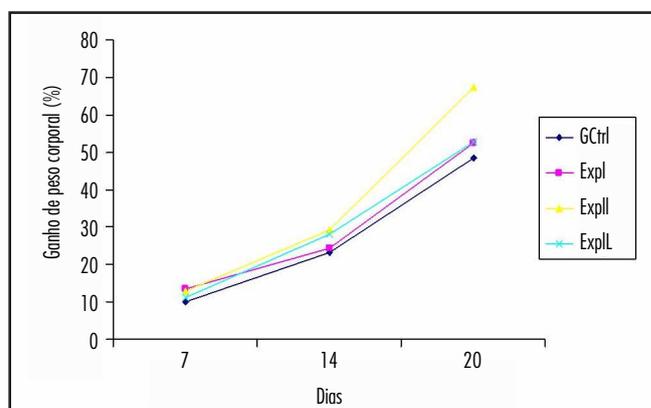


Figura 1 - Ganho percentual de peso das ratas prenhes, em função do peso inicial (no dia 0 de gestação). Os grupos são: GCtrl – veículo; e tratados com solução oral de estavudina/nelfinavir durante toda a prenhez: ExpI (1/40 mg/kg), ExpII (3/120 mg/kg) e ExpIII (9/360 mg/kg), desde o dia 0 até o 20º dia de prenhez. Nenhuma diferença estatisticamente significante foi notada

Tabela 1 - Efeito da administração da associação estavudina/nelfinavir durante a prenhez da rata albina nos vários grupos de estudo

	Grupos								Kruskal-Wallis
	GCtrl (n=10)		ExpI (n=9)		ExpII (n=9)		ExpIII (n=9)		
	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP	
Número de fetos	11,3	2,4	11,5	1,4	12,0	2,1	9,7	3,5	0,3 (NS)
Número de placentas	11,3	2,4	11,5	1,4	12,0	2,1	9,7	3,5	0,3 (NS)
Peso fetal (g)	3,9	0,3	4,4	0,4	4,4	0,3	4,3	0,3	0,06 (NS)
Peso placentário (g)	0,6	0,1	0,6	0,1	0,6	0,1	0,7	0,2	0,5 (NS)
Número de implantações	11,3	2,4	11,5	1,4	12,0	2,1	9,7	3,5	0,3 (NS)
Número de reabsorções	–	–	–	–	–	–	–	–	(NS)
Mortes maternas	0	–	1	–	1	–	1	–	(NS)
Mortes fetais	–	–	1	–	–	–	–	–	(NS)
Malformações fetais	–	–	–	–	–	–	–	–	(NS)

Dados expressos como média (M) e desvio-padrão (DP); GCtrl – controle de veículo; ExpI (1/40 mg/kg), ExpII (3/120 mg/kg) e ExpIII (9/360 mg/kg), n – número de animais; NS – diferença estatisticamente não significante

Discussão

Embora o financiamento para terapia de alta potência tenha se expandido nos últimos anos, os recursos com saúde ainda são limitados, especialmente nos países em desenvolvimento. Os custos do tratamento da AIDS, sobretudo, são altos. Assim, os agentes de primeira escolha mais utilizados nos países em desenvolvimento são os mais comuns e baratos tais como AZT, d4T, DDI e NVP. Estes são antirretrovirais genéricos produzidos geralmente por empresas farmacêuticas localizadas na China¹⁵, onde o custo de produção é muito mais barato. Em vista disto, resolvemos estudar a ação da associação estavudina/nelfinavir na prenhez da rata, com a finalidade de averiguar os possíveis efeitos indesejáveis dessa associação.

As drogas utilizadas foram administradas durante todo o período de prenhez (do dia 0 ao 20º dia de prenhez). Desta forma, pretendíamos avaliar as fases de nidação e embriogênese (até o 14º dia) e o desenvolvimento fetal (a partir do 15º dia), sempre com foco nos possíveis efeitos deletérios da associação medicamentosa sobre as matrizes e suas crias. Para o ExpI, as doses de d4T/NFV foram proporcionalmente semelhantes às recomendadas para uso terapêutico em humanos, isto é, respectivamente 1 mg/kg de d4T e 40 mg/kg de NFV por dia. Já em ExpII e ExpIII os animais foram tratados com doses três e nove vezes superiores à dose menor. Esta conduta fundamentou-se no fato de que o metabolismo hepático da rata é três vezes mais rápido que o dos humanos e também porque a depuração renal destes animais é duas vezes mais rápida^{14,16-18}.

Com relação ao ganho de peso materno obtido nos 7º, 14º e 20º dias, que correspondem às fases finais desses 3 períodos, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos estudados. Deve-se frisar que a análise do peso inicial não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os quatro grupos estudados, mostrando uma boa homogeneização dos animais utilizados. Em todos os grupos estudados, a análise do ganho de peso percentual ao logo da prenhez traduziu uma curva de normalidade não homogênea, característica do ganho ponderal das matrizes no decorrer da gestação, com aumento gradativo até o 14º dia e, a seguir, aumento exponencial até o 20º dia, sendo concordantes com inúmeros trabalhos da literatura que relataram que a última semana de prenhez na rata é a fase de maior ganho ponderal^{14,17,19-21}.

Em estudo com uso isolado de d4T, nas mesmas doses de nossa pesquisa (1, 3 e 9 mg/kg), foi observado discreto aumento de ganho ponderal no 20º dia no grupo tratado com a maior dose do antirretroviral. No entanto, não foi encontrada significância estatística²⁰. O mesmo fato ocorreu com a administração de NFV; durante a prenhez das ratas^{22,23}.

Como a principal toxicidade da d4T é a neuropatia periférica, acreditávamos que as doses maiores poderiam levar a uma diminuição da atividade de locomoção. É bem estabelecido que a neuropatia periférica habitualmente se traduz em muitas dores nas extremidades corpóreas durante locomoção. Imaginávamos que, em decorrência destes sintomas dolorosos, haveria diminuição de locomoção por parte das ratas com consequente diminuição do gasto energético e aumento de peso. Contudo, isto não ocorreu em nosso experimento. Estudo prospectivo randomizado mostrou que os inibidores da transcriptase reversa, em especial a d4T, estão associados à diminuição do tecido subcutâneo²³. Estudos recentes recomendam a utilização da d4T na terapia antirretroviral de alta potência, em dosagens menores que as inicialmente preconizadas, o que inibiria a ocorrência da lipodistrofia^{10,24}.

A implantação e desenvolvimento da placenta e do embrião são dependentes do óxido nítrico nos mecanismos de invasão trofoblástica, no entanto, é sabido que alguns antirretrovirais, como a d4T, podem atuar em mecanismos intercelulares, interferindo na ação desse potente vasodilatador, ocasionando falhas na reprodução²⁵. Porém, estudos utilizando NFV não demonstraram efeito embriotóxico deste fármaco^{21,25,26}. Por outro lado, o NFV foi responsabilizado pela elevação da taxa de perda pós-implantação e redução na taxa de viabilidade fetal, como também pela diminuição do número de fetos por ninhada²².

Deve ser mencionado que as complicações mais temíveis relatadas com o uso de d4T são o óbito por acidose láctica em mulheres grávidas ou no período puerperal, a pancreatite e a hepatite medicamentosa, e estes efeitos ocorrem principalmente quando esse fármaco está associado a outro ARV²⁷.

Em nosso experimento encontramos um óbito materno em cada grupo experimental, que ocorreu provavelmente devido ao processo de administração da droga. No entanto, outros autores, utilizando d4T por gavagem na dose de 97,5 mg/dia desde o dia inicial ao 21º dia de prenhez observaram, em ratas, aumento significativo nas taxas de perdas pós-implantação e redução significativa nas taxas de viabilidade fetal e no número de fetos por ninhada²⁸.

Com relação aos parâmetros fetais (número de fetos, peso e malformações maiores), placentários (número de placentas, peso e implantações) assim como mortes maternas e fetais nos vários grupos de estudo, apesar de haver uma morte materna em cada um dos grupos experimentais, este fato não mostrou significância estatística entre os vários grupos de estudo. A d4T ministrada em altas doses (60, 240 ou 480 mg/kg) a camundongas desde o 6º até o 16º dias de prenhez, induziu o aparecimento de malformações fetais tais como fenda palatina e hidrocefalia²⁹, no entanto, outro estudo refere que o uso isolado da d4T durante a prenhez da rata, embora sem resultados

estatisticamente significantes, revelaram aumento do número de implantações e reabsorções fetais no grupo exposto à dose de 9 mg/kg²⁰.

O NFV é um inibidor de protease viral com especificidade para o vírus HIV, utilizado com muita frequência nos esquemas de antirretrovirais combinados para as gestantes infectadas. Recentemente, foi relatado que também inibe a ação da glicoproteína Gp41 viral indutora de apoptose nas células placentárias normais, envolvendo a caspase 3 pela via mitocondrial. Além disto, estimula a morte de células tumorais por mecanismo relacionados ao retículo endoplasmático, denominado de estresse do retículo endoplasmático¹². Por outro lado, pouco se sabe sobre as repercussões desse fármaco sobre a gestação. Parece ter poucos efeitos colaterais, entre os quais os mais comuns são os distúrbios gastrointestinais de leve intensidade, além de possuir praticidade posológica de duas tomadas diárias, o que facilita a adesão ao tratamento. No ano de 2007, esta substância foi retirada parcialmente do mercado devido a indícios de contaminação durante sua produção com o metano sulfato de etila, agente cancerígeno^{30,31}.

Muitos estudos têm relatado que a exposição intrauterina a antirretrovirais, principalmente aos inibidores da

protease (IsP), pode estar relacionada a prematuridade e baixo peso ao nascer. O aumento da expressividade da glicoproteína P (P-gp) está diretamente relacionado ao período de duração do uso dos IsP e, consequentemente, sua queda na concentração intracelular. A P-gp está situada na superfície materna da placenta e sua função é expulsar xenobióticos das células trofoblásticas de volta à circulação materna, limitando a exposição fetal às drogas. Ela é codificada pelos genes MDR presentes em humanos e roedores. Em ratas, a concentração destes genes foi demonstrada em torno do 11º dia de gestação e sua expressão eleva-se com o evoluir da gestação até níveis máximos, observados ao final da prenhez. Seu objetivo é proteger o feto de possíveis efeitos nocivos desses xenobióticos nas trocas materno fetais^{32,33}.

Assim, esta pesquisa procurou estudar os possíveis efeitos da administração diária da associação estavudina/nelfinavir sobre as ratas prenhes e seus conceptos, especialmente sob o aspecto toxicidade no desenvolvimento fetal. Acreditamos que os objetivos da pesquisa foram alcançados e consistentemente demonstrados. Concluímos que a associação estavudina/nelfinavir em todas as doses ministradas não interferiu no ganho de peso das ratas prenhes e não mostrou efeitos deletérios sobre os conceptos.

Referências

1. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS. Metas e compromissos assumidos pelos Estados-Membros na sessão especial da Assembleia Geral das Nações Unidas em HIV/AIDS. UNGASS – HIV/Aids. [cited 2010 Apr 04]. Available from: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/relatorio_ungass_2008_pt.pdf.
2. UNAIDS. Data shows progress needed on HIV testing and treatment for children and mothers. 2009 [cited 2010 Apr 04]. Available from: http://www.unaids.org/en/KnowledgeCentre/Resources/FeatureStories/archive/2009/20091130_Stocktaking_rep.asp.
3. Klein RS. Trends related to aging and co-occurring disorders in HIV-infected drug users. *Subst Use Misuse*. 2011;46(2-3):233-44.
4. Palella Junior FJ, Baker RK, Moorman AC, Chmiel JS, Wood KC, Brooks JT, et al. Mortality in the highly active antiretroviral therapy era: changing causes of death and disease in the HIV outpatient study. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2006;43(1):27-34.
5. Leone S, Gregis G, Quinzan G, Velenti D, Cologni G, Soavi L, et al. Causes of death and risk factors among HIV-infected persons in the HAART era: analysis of a large urban cohort. *Infection*. 2011;39(1):13-20.
6. Stanecki K, Daher J, Stover J, Beusenbergh M, Souteyrand Y, García Calleja JM. Antiretroviral therapy needs: the effect of changing global guidelines. *Sex Transm Infect*. 2010;86 Suppl 2:ii62-6.
7. Mahajan AP, Hogan JW, Snyder B, Kumaraswamy N, Mehta K, Solomon S, et al. Changes in total lymphocyte count as a surrogate for changes in CD4 count following initiation of HAART: implications for monitoring in resource-limited settings. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2004;36(1):567-75.
8. Kumarasamy N, Vallabhaneni S, Cecelia AJ, Yephthomi T, Balakrishnan P, Saghayam S, et al. Reasons for modification of generic highly active antiretroviral therapeutic regimens among patients in southern India. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2006;41(1):53-8.
9. Yang G, Dutschman GE, Wang CJ, Tanaka H, Baba M, Anderson KS, et al. Highly selective action of triphosphate metabolite of 4'-ethynyl D4T: a novel anti-HIV compound against HIV-1 RT. *Antiviral Res*. 2007;73(3):185-91.
10. Hamers RL, Wensing AM, Back NK, Arcilla MS, Frissen JP. Multi-nucleoside reverse transcriptase inhibitor resistant HIV type-1 in a patient from Sierra Leone failing stavudine, lamivudine and nevirapine. *Antivir Ther*. 2011;16(1):115-8.
11. Brower ET, Bacha UM, Kawasaki Y, Freire E. Inhibition of HIV-2 protease by HIV-1 protease inhibitors in clinical use. *Chem Biol Drug Des*. 2008;71(4):298-305.
12. Brüning A, Gingelmaier A, Friese K, Mylonas I. New prospects for nelfinavir in non-HIV-related diseases. *Curr Mol Pharmacol*. 2010;3(2):91-7.
13. Braga Neto MB, Aguiar CV, Maciel JG, Oliveira BM, Sevilleja JE, Oriá RB, et al. Evaluation of HIV protease and nucleoside reverse transcriptase inhibitors on proliferation, necrosis, apoptosis in intestinal epithelial cells and electrolyte and water transport and epithelial barrier function in mice. *BMC Gastroenterol*. 2010;10:90.
14. Wagner A, de Carvalho AM, Nakamura MU, Simões RS, Fontes TM, Espiridião S, et al. Análise morfológica e fisiológica dos

- fígados e rins de ratas prenhes e seus fetos tratados pela associação zidovudina, lamivudina e ritonavir durante toda a prenhez. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2010;32(11):556-62.
15. Zhou F, Kominski GF, Qian HZ, Wang J, Duan S, Guo Z, et al. Expenditures for the care of HIV-infected patients in rural areas in China's antiretroviral therapy programs. *BMC Med.* 2011;9:6-10.
 16. Travlos GS, Morris RW, Elwel MR, Duke A, Rosenblum S, Thompson MB. Frequency and relationships of clinical chemistry and liver and kidney histopathology findings in 13-week toxicity studies in rats. *Toxicology.* 1996;107(1):17-29.
 17. Carvalho AM, Simões RS, Oliveira FHM, Simões MJ, Oliveira-Filho RM, Nakamura MU, et al. Análise morfológica dos fígados e rins no binômio materno-fetal após tratamento de ratas prenhes com ritonavir durante toda a prenhez. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2007;29(7):348-53.
 18. Quintino MP, Nakamura MU, de Jesus Simões M, Araujo Júnior E, Oliveira-Filho RM, Torloni MR, et al. Chronic use of indinavir in albino rat pregnancy (*Rattus norvegicus albinus*, Rodentia, Mammalia): biological assay. *J Obstet Gynaecol Res.* 2011;37(6):630-3.
 19. Baba T, Nagahama M, Akiyama N, Miki T. Experimental production of malformations due to acetyl salicylate and phenyl salicylate in rats. *Osaka City Med J.* 1966;12(1):23-9.
 20. Barreto RL, de Jesus Simões M, Amed AM, Soares Júnior JM, Oliveira-Filho RM, Kulay Junior L. Stavudine effects on rat pregnancy outcome. *J Obstet Gynaecol Res.* 2004;30(3):242-5.
 21. Mathias CV, Mathias CF, Simões MJ, Amed AM, Simões RS, Oliveira-Filho RM, et al. Safety of nelfinavir use during pregnancy. An experimental approach in rats. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 2005;32(3):163-5.
 22. Figueiró-Filho EA, Duarte G, Rosa e Silva AAM, Lopes da Fonseca BA, Mussi-Pinhata MM, Quintana SM, et al. Efeito das drogas anti-retrovirais sobre as taxas de fertilidade de ratas Wistar. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2002;24(10):647-52.
 23. Shlay JC, Sharma S, Peng G, Gibert CL, Grunfeld C; Terry Bein Community Programs for Clinical Research on AIDS (CPCRA), et al. The effect of individual antiretroviral drugs on body composition in HIV-infected persons initiating highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2009;51(3):298-304.
 24. Cournil A, Coudray M, Kouanfack C, Essomba CN, Tonfack CA, Biwolé-Sida M, et al. Reduced dose of stavudine and lipoatrophy in HIV-infected patients in Cameroon. *Antivir Ther.* 2010;15(7):1039-43.
 25. Sutliff RL, Dikalov S, Weiss D, Parker J, Raidel S, Racine AK, et al. Nucleoside reverse transcriptase inhibitors impair endothelium-dependent relaxation by increasing superoxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;283(6):H2363-70.
 26. Burns-Naas LA, Stump DG, Webber S, Holson JF, Masarjian L, Furman G, et al. Absence of reproductive and developmental toxicity in rats following oral dosing with nelfinavir. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2003;38(3):304-16.
 27. Lenzo NP, Garas BA, French MA. Hepatic steatosis and lactic acidosis associated with stavudine treatment in an HIV patient: a case report. *AIDS.* 1997;11(10):1294-6.
 28. Boyd MA, Hill AM. Clinical management of treatment-experienced, HIV/AIDS patients in the combination antiretroviral therapy era. *Pharmacoeconomics.* 2010;28 Suppl 1:17-34.
 29. Price CJ, George JD, Marr MC, Myers CB, Bieler GS, Williams RL, et al. Prenatal developmental toxicity evaluation of 2',3'-dideoxyinosine (ddI) and 2',3'-dideoxy-3'-deoxythymidine (d4T) co-administered to Swiss Albino (CD-1) mice. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* 2006;77(3):207-15.
 30. Gocke E, Bürgin H, Müller L, Pfister T. Literature review on the genotoxicity, reproductive toxicity, and carcinogenicity of ethyl methanesulfonate. *Toxicol Lett.* 2009;190(3):254-65.
 31. Müller L, Gocke E, Lavé T, Pfister T. Ethyl methanesulfonate toxicity in Viracept – a comprehensive human risk assessment based on threshold data for genotoxicity. *Toxicol Lett.* 2009;190(3):317-29.
 32. Tanabe M, Ieiri I, Nagata N, Inoue K, Ito S, Kanamori Y, et al. Expression of P-glycoprotein in human placenta: relation to genetic polymorphism of the multidrug resistance (MDR)-1 gene. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001;297(3):1137-43.
 33. Evseenko DA, Paxton JW, Keelan JA. ABC drug transporter expression and functional activity in trophoblast-like cell lines and differentiating primary trophoblast. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006;290(5):R1357-65.