

Ione Dilma de Oliveira Gil

**Parâmetros Laboratoriais para Monitoramento da Terapia Anti-Retroviral e Avaliação da Eficácia do Regime Terapêutico com Inibidores da Transcriptase Reversa**

**Florianópolis  
2001**

Ione Dilma de Oliveira Gil

**Parâmetros Laboratoriais para Monitoramento da Terapia Anti-Retroviral e Avaliação da Eficácia do Regime Terapêutico com Inibidores da Transcriptase Reversa**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do grau de Mestre em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Celso Spada

**Florianópolis  
2001**

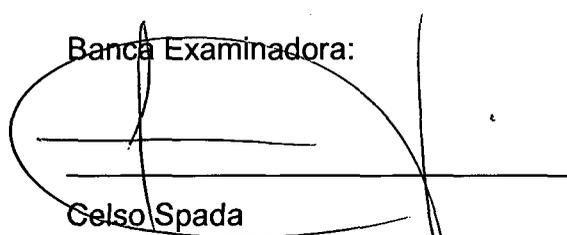
Parâmetros Laboratoriais para Monitoramento da Terapia  
Anti-Retroviral e Avaliação da Eficácia do Regime  
Terapêutico com Inibidores da Transcriptase Reversa

POR

IONE DILMA DE OLIVEIRA GIL

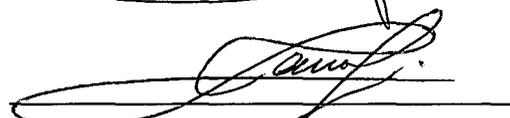
Dissertação julgada e aprovada em  
sua forma final pelo Orientador e  
membros da Banca Examinadora,  
composta pelos Professores  
Doutores:

Banca Examinadora:



Celso Spada

(ACL/CCS/UFSC - Orientador)



Carlos Roberto Zanetti

(MIP/CCB/UFSC – Membro Titular)



Teresinha de Jesus Carvalho Neiva

(ACL/CCS/UFSC – Membro Titular)



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tânia Beatriz Creczynski Pasa

Coordenadora do Programa de Pós- Graduação em Farmácia da UFSC

Florianópolis, 20 de dezembro de 2001

---

## ABREVIATURAS EMPREGADAS

Ac	Anticorpo
Ag	Antígeno
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ARV	Anti-retroviral
bDNA	Branched DNA
$\beta$ 2M	Beta-2 Microglobulina
CCR-5	Receptor de Quimiocina de Monócitos/Macrófagos
cDNA	Ácido Disoxirribonucleico Complementar
CD3	Grupamento de Diferenciação (Cluster of Differentiation)
CD4	Grupamento de Diferenciação (Cluster of Differentiation)
CMV	Citomegalovírus
CTL	Linfócito T Citotóxico
CXCR-4	Receptor de Quimiocinas de Células T
ddC	Zalcitabina
ddI	Didanosina
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DST	Doença Sexualmente Transmissível
DTH	Hipersensibilidade do Tipo Tardia
D4T	Estavudina
EBV	Epstein Barr Vírus
ELISA	Enzima Imunoensaio
EPO	Eritropoetina
FDA	Food and Drug Administration
Fe <sup>++</sup>	Íon Ferro no estado Ferroso (Bivalente)

---

GM-CSF	Fator de crescimento de células Mono-Granulocíticas
gp41	Glicoproteína 41
gp120	Glicoproteína 120
gp160	Glicoproteína 160
HBV	Vírus da Hepatite B
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HIV-1	Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 1
HIV-2	Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 2
HSV	Vírus do Herpes Simples
HTLV-III	Vírus Linfotrópico Humano Tipo -III
IFI	Imunofluorescência Indireta
IgA	Imunoglobulina A
IgD	Imunoglobulina D
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL-1	Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2
IL-2R	Receptor de Interleucina 2
INF- $\gamma$	Interferon - $\gamma$
KD	Kilodalton
LAV	Vírus Associado a Linfadenopatia
LB	Linfócito B
LT	Linfócito T
LTCD4	Linfócito TCD4
LTCD8	Linfócito LTCD8

---

LTR	Repetição Terminal Longa
mg	Miligrama
MHC	Complexo de Histocompatibilidade Maior
mL	Mililitros
mm <sup>3</sup>	Milímetro Cúbico
mRNA	RNA mensageiro
NF- $\kappa$ B	Fator de Transcrição Nuclear - $\kappa$ B
NK	Natural Killer
nm	Nanômetro
p7	Proteína 7
p9	Proteína 9
p17	Proteína 17
p24	Proteína 24
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RER	Retículo Endoplasmático Rugoso
RH	Ribonuclease H
RNA	Ácido Ribonucleico
ssRNA	Ácido Ribonucleico Genômico
TARV	Terapia Anti-retroviral
TCR	Receptor de Células T
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral - $\alpha$
TNF -R	Receptor para Fator de Necrose Tumoral
TR	Transcriptase Reversa
VCM	Volume Corpuscular Médio
ZDV	Zidovudina
3TC	Lamivudina

---

## RESUMO

A síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) é uma manifestação clínica avançada da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV-1 e HIV-2). A AIDS, foi descrita pela primeira vez em 1981 nos Estados Unidos, em Los Angeles, Nova York e San Francisco em um grupo de pacientes que apresentavam patologias não usuais que incluíam, pneumonia por *Pneumocystis carinii* (comum em pessoas imunodeprimidas), Sarkoma de Kaposi (tumor raro de pele) e outras infecções oportunistas. Uma avaliação mais completa destes pacientes mostrou que eles tinham em comum uma significativa diminuição da resposta imunocelular e diminuição das células T *helper* (TCD<sub>4</sub>) e estes pacientes eram na sua maioria homossexuais masculinos. A distribuição geográfica da AIDS mostra a não existência de fronteiras à sua dispersão, atingindo todos os continentes. O maior número de casos relatados ocorre na África, seguido pela Ásia e América do Sul. Desde a sua descoberta em 1981, a AIDS aumentou em proporções epidêmicas em todo mundo, embora a morte pela AIDS tem mostrado redução nos últimos anos graças ao tratamento com anti-retrovirais, bem como por campanhas de prevenção realizadas pelos órgãos Institucionais. No Brasil o número de casos diagnosticados de AIDS até março de 2001 era de 203.353 segundo o Ministério da Saúde. No estado Santa Catarina os dados atuais apontam 18.63 casos diagnosticados/100.000 habitantes (dados ainda em aberto), sendo que a cidade de Florianópolis – SC é a vigésima cidade no Brasil em número de casos, e, a décima terceira com maior incidência por 100.000 habitantes. As formas mais comuns de transmissão do HIV são: transmissão sexual (relações homossexuais, bissexuais e heterossexuais); transmissão vertical; uso de drogas injetáveis e transfusões de sangue e hemoderivados que não foram testados para a presença do Ac ou Ag do HIV. O agente etiológico da AIDS, foi identificado em 1983 por Luc Montagner e col. e foi denominado vírus da Imunodeficiência humana – HIV. O HIV é um retrovírus da família Retroviridae, caracterizado por ter uma replicação dependente de um DNA complementar. O HIV possui tropismo por células que expressam em suas

---

membranas receptores CD4, principalmente os linfócitos T *helper*. A infecção crônica destas células resulta em redução quantitativa e qualitativa de suas funções, gerando uma severa imunossupressão que culmina no surgimento de infecções oportunistas, muitas vezes não usuais. Em pacientes HIV positivos, o aumento na susceptibilidade da morte por apoptose é observado em células CD4 e CD8 e está correlacionado com o estado geral de ativação do sistema imune. Com a terapia anti-retroviral eficiente, observa-se diminuição na susceptibilidade para apoptose bem como diminuição na ativação do sistema imune resultando em aumento da proliferação e redistribuição dos linfócitos para o sangue periférico. O objetivo deste trabalho foi avaliar, o efeito em pacientes HIV soropositivos da terapia anti-retroviral sobre alguns parâmetros imunológicos que envolvem ativação e resposta imune, parâmetros hematológicos e viabilidade celular. Neste estudo 10 pacientes HIV soropositivos, assintomáticos e que ainda não haviam utilizado nenhum tratamento anti-retroviral, foram avaliados num período de 180 dias. O regime terapêutico instituído foi conforme o consenso terapêutico utilizado por médicos do Hospital Nereu Ramos e do Posto de Saúde II, que consiste em dois inibidores da transcriptase reversa. De acordo com os resultados obtidos a contagem de células CD4, CD8 e carga viral, mostraram-se bons marcadores para monitoramento da evolução da infecção independentes da eficácia da terapia anti-retroviral. Os parâmetros imunológicos como  $\beta$ -2 microglobulina, TNF- $\alpha$ , imunoglobulinas e a avaliação da viabilidade celular, podem ser utilizados como marcadores da recuperação do sistema imune após o tratamento. Com relação à eficácia do regime terapêutico utilizado por nossos pacientes, 90% apresentaram uma resposta positiva, com redução da carga viral, aumento na contagem de CD4, manutenção na contagem de CD8, redução da apoptose e redução da ativação imune.

---

## ABSTRAT

The Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) is an advanced clinical manifestation of the infection by the Human Immune Deficiency Virus (HIV-1 and HIV-2). AIDS was first described in 1981 in the United States, in Los Angeles, New York and San Francisco, in groups of patients who presented unusual pathologies which included pneumonia by "Pneumocystis carini" (common in immune depressed people), "Sarkoma de Kaposi" (A rare skin tumour) and other opportunist infections. A more detailed evaluation of those patients show that they all had a significant decrease in the immune cellular response and also a decrease in the number of "T Helper" cells (TDC4). Most of those patients were male homosexuals. The geographic distribution of AIDS shows that there are no boundaries for its dispersion, reaching all the continents. The biggest number of reported cases occur in Africa, followed by Asia and South America. AIDS has increased worldwide in epidemic proportions since its discovery in 1981. Though, death due to AIDS has decreased in the last years because of the treatment with anti-retrovirals. In Brazil, the number of diagnosed cases up to march of 2001 was 203.353, according to the Ministry of Health. In the state of Santa Catarina, the latest numbers indicate 18.63 diagnosed cases to every 100.000 citizens. Florianópolis, the capital of Santa Catarina is the twentieth city in Brazil, concerning the number of reported cases of AIDS, and it is the city with the thirteenth biggest incidence. The most common ways of transmitting the HIV are: sexual transmission (through homosexual, bisexual and heterosexual relations); vertical transmission; use of injectable drugs, and transfusion of blood and hemoderived substances witch haven't been tested previously. The etiological agent of AIDS was identified in 1983 by Luc Montagner e Col and was named Human Immune Deficiency Virus – HIV. The HIV is a retro-virus from the retroviridae family, characterized by a dependant replication of a complementary DNA. The HIV has tropism through cells which express in their membranes CD4 receptors, mainly T helper lymphocytes. The chronic infection of those cells results in a qualitative and quantitative reduction of their functions, causing a severe immune suppression which culminates in the a appearance of opportunist infections, often unusual. The increase

in the proneness to death from apoptosis in HIV positives is observed in CD4 and CD8 cells and it is co-related to the general state of the immune-system activation. With an effective anti-retroviral therapy, a decrease in the proneness to apoptosis is observed, as well as a decrease in the immune-system activation, which propitiates an increment in the proliferation and redistribution of lymphocytes in the peripheral blood. The objective of this study was to evaluate the effects of anti-retroviral therapy on some immunologic parameters which involve activation and immune – response, hematologic parameters and cellular viability. In this study, 10 HIV positives, asymptomatics and who still had not used any anti-retroviral treatment were evaluated during 180 days. The therapeutic regime instituted was according to the therapeutic consensus used by doctors from hospital Nereu Ramos and from Posto de Saúde II, and consists in two inhibitors of the reverse transcriptase. According to the obtained results, the counting and the viral load of the CD-4 and CD-4 and CD-8 cells were considered good independent indicators of anti-retroviral therapy effectiveness. The immunologic parameters such as  $\beta$ -2 microglobulin, TNF, immunoglobulin and the evaluation of the cellular viability can be used as indicators of immune- system recuperation, after the treatment. In terms of effectiveness of the therapeutic regime used by our patients, 90% show positive response with reduction of the viral load, increase in the CD4 counting, maintenance in the CD8 counting, reduction of apoptosis and reduction of immune activation.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>i</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRAT .....</b>	<b>vi</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>01</b>
<b>1.1 Síndrome da Imunodeficiência Adquirida – AIDS .....</b>	<b>01</b>
<b>1.2 O Vírus HIV.....</b>	<b>03</b>
<b>1.3 Estrutura do HIV .....</b>	<b>05</b>
<b>1.4 O Ciclo de Vida do HIV.....</b>	<b>06</b>
<b>1.5 Infecção das Células Alvo, Ativação do Provírus e Latência Viral .....</b>	<b>10</b>
<b>1.6 Efeito Citopático do HIV.....</b>	<b>13</b>
<b>1.7 Transmissão .....</b>	<b>14</b>
<b>1.8 Manifestações da Doença pelo HIV .....</b>	<b>17</b>
<b>1.9 Alterações Imunológicas Associadas com a Infecção Pelo HIV .....</b>	<b>19</b>
<b>1.10 Diagnóstico de AIDS .....</b>	<b>20</b>
<b>1.11 Diagnóstico Laboratorial .....</b>	<b>20</b>
<b>1.12 Apoptose.....</b>	<b>23</b>
<b>1.13 Apoptose e HIV.....</b>	<b>26</b>
<b>1.14 Anemia e Metabolismo do Ferro .....</b>	<b>29</b>
<b>1.15 Plaquetas .....</b>	<b>33</b>
<b>1.16 Leucócitos .....</b>	<b>34</b>
<b>1.17 Imunoglobulinas.....</b>	<b>37</b>

---

<b>1.17 Beta 2 Microglobulina .....</b>	<b>40</b>
<b>1.18 Terapia Anti-Retroviral .....</b>	<b>41</b>
<b>1.18.1 Fármacos Anti-Retrovirais Para Tratamento da Infecção Pelo HIV .....</b>	<b>43</b>
<b>1.18.1.1 Zidovudina .....</b>	<b>45</b>
<b>1.18.1.2 Uso Clínico.....</b>	<b>45</b>
<b>1.18.1.3 Efeitos Colaterais .....</b>	<b>46</b>
<b>1.18.1.4 Resistência do HIV a ZDV .....</b>	<b>47</b>
<b>1.18.2 Didanosina .....</b>	<b>48</b>
<b>1.18.2.1 Uso Clínico.....</b>	<b>48</b>
<b>1.18.2.2 Efeitos Colaterais .....</b>	<b>49</b>
<b>1.18.2.3 Resistência do HIV a Didanosina .....</b>	<b>49</b>
<b>1.18.3 Zalcitabina (DdC) .....</b>	<b>50</b>
<b>1.19 Inibidores da Protease .....</b>	<b>50</b>
<b>1.20 Terapia Combinada .....</b>	<b>51</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>54</b>
<b>2.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>54</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos .....</b>	<b>54</b>
<b>3. PACIENTES E MÉTODOS .....</b>	<b>56</b>
<b>3.1 Aspectos éticos .....</b>	<b>56</b>
<b>3.2 Pacientes.....</b>	<b>57</b>
<b>3.3 Fracionamento do Sangue .....</b>	<b>58</b>

---

<b>3.4 Hemograma.....</b>	<b>59</b>
<b>3.5 Níveis Séricos de Ferritina .....</b>	<b>59</b>
<b>3.6 Níveis de Ferro Sérico.....</b>	<b>60</b>
<b>3.7 Determinação dos Níveis das Imunoglobulinas A, G e M.....</b>	<b>61</b>
<b>3.8 Dosagem de TNF-<math>\alpha</math> e <math>\beta</math>-2-Microglobulina .....</b>	<b>61</b>
<b>3.9 Viabilidade Celular .....</b>	<b>62</b>
<b>3.10 Contagem diferencial de Linfócitos CD4 e CD8.....</b>	<b>64</b>
<b>3.11 Determinação da Carga Viral.....</b>	<b>65</b>
<b>3.12 Análise Estatística.....</b>	<b>67</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>68</b>
<b>4.1 Efeito da terapia anti-retroviral sobre a contagem de linfócitos TCD4.....</b>	<b>68</b>
<b>4.2 Efeito da TARV sobre a contagem de células CD8.....</b>	<b>70</b>
<b>4.3 Efeito da Terapia Anti-retroviral sobre a Carga Viral .....</b>	<b>75</b>
<b>4.4 Efeito da TARV sobre a Viabilidade das Células Mononucleares do Sangue Periférico.....</b>	<b>78</b>
<b>4.5 Efeito da Terapia Anti-retroviral sobre a contagem de Leucócitos totais e Linfócitos totais.....</b>	<b>83</b>
<b>4.6 Efeito da Terapia Anti-retroviral sobre os Marcadores Séricos de Anemia.....</b>	<b>87</b>
<b>4.7 Avaliação da terapia anti-retroviral sobre os marcadores hematológicos de anemia .....</b>	<b>91</b>
<b>4.8 Efeito da terapia anti-retroviral sobre a contagem de Plaquetas .....</b>	<b>96</b>

<b>4.9 Efeito da Terapia Anti-retroviral sobre os valores de VCM .....</b>	<b>98</b>
<b>4.10 Efeito da Terapia Anti-retroviral sobre as Imunoglobulinas.....</b>	<b>100</b>
<b>4.11 Avaliação da terapia anti-retroviral sobre os níveis de TNF-<math>\alpha</math> .....</b>	<b>106</b>
<b>4.12 Efeito da terapia anti-retroviral sobre a dosagem de <math>\beta</math>-2 microglobulina</b>	<b>108</b>
<b>5 – CONCLUSÕES .....</b>	<b>112</b>
<b>6 – REFERÊNCIAS.....</b>	<b>114</b>
<b>7 – ANEXOS .....</b>	<b>130</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01 – Virus HIV.....</b>	<b>03</b>
<b>Figura 02 – Genoma do Virus HIV .....</b>	<b>05</b>
<b>Figura 03 – Etapas da Infecção da célula hospedeira pelo HIV .....</b>	<b>11</b>
<b>Figura 04 – Evolução típica da infecção pelo HIV .....</b>	<b>17</b>
<b>Figura 05 - Fluxograma do Ministério da Saúde para o Diagnóstico do HIV..</b>	<b>23</b>
<b>Figura 06 - Determinação diferencial de Linfócitos TCD<sub>4</sub> em U/mm<sup>3</sup>, nos tempos estudados. ....</b>	<b>69</b>
<b>Figura 07 - Determinação diferencial de Linfócitos TCD<sub>4</sub> em U/mm<sup>3</sup>, nos tempos estudados. ....</b>	<b>72</b>
<b>Figura 08 - Determinação da Carga Viral, em número de cópias/ml, nos tempos estudados. ....</b>	<b>76</b>

---

<b>Figura 09 - Número de células viáveis, em porcentagem, nos tempos estudados. ....</b>	<b>79</b>
<b>Figura 10 - Número de células apopticas, em porcentagem nos tempos estudados ....</b>	<b>80</b>
<b>Figura 11 - Número de células inviáveis, em porcentagem, nos tempos estudados. ....</b>	<b>81</b>
<b>Figura 12 - Enumeração de Leucócitos totais, em células por milímetros cúbicos, nos tempos estudados. ....</b>	<b>84</b>
<b>Figura 13 - Enumeração dos Linfócitos Totais, em porcentagem, nos tempos estudados. ....</b>	<b>86</b>
<b>Figura 14 - Determinação de Ferro Sérico, em <math>\mu\text{g/dL}</math>, nos tempos estudados.</b>	<b>88</b>
<b>Figura 15 - Determinação da Ferritina Sérica, <math>\text{ng/dL}</math>, nos tempos estudados.</b>	<b>90</b>
<b>Figura 16- Enumeração de eritrócitos em milhões por milímetros cúbicos, nos pacientes estudados ....</b>	<b>92</b>
<b>Figura 17 - Determinação do valor do hematócrito sangüíneo, em porcentagem, nos tempos estudados. ....</b>	<b>93</b>
<b>Figura 18 - Níveis de Hemoglobina sangüínea, em <math>\text{g/dL}</math>, nos tempos estudados. ....</b>	<b>94</b>
<b>Figura 19 - Enumeração de plaquetas sangüíneas, em milhares por <math>\text{mm}^3</math>, nos tempos estudados. ....</b>	<b>98</b>
<b>Figura 20 - Volume Corpuscular Médio (VCM) dos eritrócitos sangüíneos, em fl, nos tempos estudados ....</b>	<b>100</b>
<b>Figura 21 - Imunoglobulina A, em <math>\text{mg/dL}</math>, nos tempos estudados ....</b>	<b>102</b>
<b>Figura 22 - Imunoglobulina G, em <math>\text{mg/dL}</math>, nos tempos estudados ....</b>	<b>103</b>

---

<b>Figura 23 - Imunoglobulina M, em mg/dL, nos tempos estudados .....</b>	<b>104</b>
<b>Figura 24 - Fator de Necrose Tumoral, em pg/ml, nos tempos estudados ..</b>	<b>107</b>
<b>Figura 25 - Determinação dos níveis de Beta2 Microglobulina, em ng/ml, nos tempos estudados.....</b>	<b>109</b>

### LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01 - Determinação diferencial de Linfócitos TCD<sub>4</sub> em U/mm<sup>3</sup>, nos tempos estudados. ....</b>	<b>68</b>
<b>Tabela 02 - Determinação diferencial de Linfócitos CD8 em U/mm<sup>3</sup>, nos tempos estudados. ....</b>	<b>71</b>
<b>Tabela 3 - Determinação da Carga Viral, em número de cópias/ml, nos tempos estudados. ....</b>	<b>75</b>
<b>Tabela 04 - Número de células viáveis, em porcentagem, nos tempos estudados. ....</b>	<b>78</b>
<b>Tabela 05 - Número de células apópticas, em porcentagem nos tempos estudados. ....</b>	<b>79</b>
<b>Tabela 06 - Número de células inviáveis, em porcentagem, nos tempos estudados. ....</b>	<b>80</b>
<b>Tabela 07 - Enumeração de Leucócitos totais, em células por milímetros cúbicos, nos tempos estudados. ....</b>	<b>84</b>
<b>Tabela 08 - Enumeração dos Linfócitos totais, em porcentagem, nos tempos estudados. ....</b>	<b>85</b>
<b>Tabela 09 - Determinação de Ferro Sérico, em µg/dL, nos tempos estudados.</b>	<b>87</b>

---

<b>Tabela 10 - Concentração da Ferritina Sérica, ng/dL, nos tempos estudados.</b>	<b>89</b>
<b>Tabela 11 - Enumeração de eritrócitos em milhões por milímetros cúbicos, nos pacientes estudados.</b>	<b>91</b>
<b>Tabela 12 - Determinação do valor do hematócrito sangüíneo, em porcentagem, nos tempos estudados.</b>	<b>93</b>
<b>Tabela 13 - Níveis de Hemoglobina sangüínea, em g/dL, nos tempos estudados</b>	<b>94</b>
<b>Tabela 14 - Enumeração de plaquetas sangüíneas, em milhares por mm<sup>3</sup>, nos tempos estudados.</b>	<b>97</b>
<b>Tabela 15 – Volume Corpuscular Médio dos eritrócitos sangüíneos, em fl, nos tempos estudados.</b>	<b>99</b>
<b>Tabela 16 - Imunoglobulina A, em mg/dL, nos tempos estudados</b>	<b>102</b>
<b>Tabela 17 - Imunoglobulina G, em mg/dL, nos tempos estudados</b>	<b>103</b>
<b>Tabela 18 - Imunoglobulina M, em mg/dL, nos tempos estudados</b>	<b>104</b>
<b>Tabela 19 – Fator de Necrose Tumoral, em pg/ml, nos tempos estudados</b>	<b>106</b>
<b>Tabela 20 - Determinação dos níveis de <math>\beta</math>-2 Microglobulina Microglobulina, em pg/mL, nos tempos estudados.</b>	<b>109</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Síndrome da Imunodeficiência Adquirida - AIDS

A síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) é uma manifestação clínica avançada da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV-1 e HIV-2).

A AIDS, foi descrita pela primeira vez em 1981 nos Estados Unidos, em Los Angeles, Nova York e San Francisco em um grupo de pacientes que apresentavam patologias não usuais que incluíam, pneumonia por *Pneumocystis carinii* (comum em pessoas imunodeprimidas), Sarkoma de Kaposi (tumor raro de pele) e outras infecções oportunistas. Uma avaliação mais completa destes pacientes mostrou que eles tinham em comum uma significativa diminuição da resposta imune celular e diminuição das células T *helper* (TCD4) e estes pacientes eram na sua maioria homossexuais masculinos (MMWR, 1981).

Uma das principais características da infecção pelo HIV é a depleção seletiva dos linfócitos TCD4, fundamentais na resposta imune. A patogenia viral da AIDS é caracterizada por uma série de eventos ordenados e seqüenciais, posteriores à infecção do hospedeiro. Estes eventos estão baseados em: replicação viral nas células apresentadoras de antígenos que expressam receptores CD4, como monócitos e linfócitos TCD4 em tecidos linfóides e outros sítios; resposta imune celular e humoral que resulta em contenção parcial do vírus; reativação da replicação viral com aumento da viremia e diminuição da contagem de linfócitos TCD4 (HO, 1995).

A replicação viral ativa ocorre em todos os estágios da doença (HO 1989; Embreston 1993). Os tecidos linfóides funcionam como sítio primário de replicação do HIV, e todos os indivíduos infectados pelo HIV, a despeito do estágio clínico da doença, apresentam viremia plasmática (WEI, 1995; HO, 1995).

A distribuição geográfica da AIDS mostra a não existência de fronteiras à sua dispersão, atingindo todos os continentes. O maior número de casos relatados ocorre na África, seguido pela Ásia e América do Sul (Bol. Epidemiol. 2001). Desde a sua descoberta em 1981, a AIDS aumentou em proporções epidêmicas em todo mundo, embora a morte pela AIDS tem mostrado redução nos últimos anos graças ao tratamento com anti-retrovirais.

No Brasil, o número de casos diagnosticados de AIDS até março de 2001 era de 203.353, segundo o Ministério da Saúde. No estado Santa Catarina, os dados atuais apontam 18.63 casos diagnosticados/100.000 habitantes (dados ainda em aberto), sendo que a cidade de Florianópolis, Santa Catarina, é a vigésima cidade no Brasil em número de casos, e, a décima terceira com maior incidência por 100.000 habitantes (BOL. EPIDEMIOLOGIA. 2001).

## 1.2 O Vírus HIV

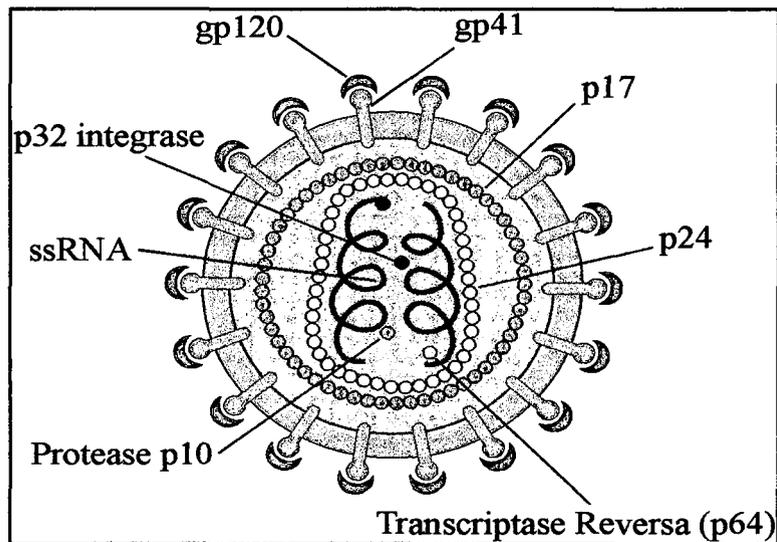


Figura 01 – Vírus HIV.

Fonte: Kuby Immunology 2000.

Em 1983, em Paris, Barré-Sinoussi e col. isolaram um retrovírus de um paciente com linfadenopatia e o denominaram *Lymphadenopathy Associated Vírus* (LAV). Em 1984, Gallo e col., nos Estados Unidos, isolaram um retrovírus e o denominaram *Human T Cell Lymphotropic Vírus Type III* (HTLV III) de alguns pacientes com AIDS. Estudos posteriores permitiram concluir que se tratava do mesmo vírus. Vários pesquisadores usaram denominações diferentes como, *Immunodeficiency-Associated Vírus* (IDAV), *AIDS-Associated Retrovírus* (ARV) e outros, para o mesmo vírus. Em 1986, o Comitê de Taxonomia de Vírus propôs um nome único para o retrovírus recentemente isolado, e, confirmado como sendo o agente causador da AIDS. O retrovírus passou então a ser oficialmente designado de *Human Immunodeficiency Vírus* (HIV) (COFFIN, 1986).

---

O HIV é um membro da família retroviridae, da subfamília dos lentivírus (BARRE-SINOUSI, 1983 e GALLO 1984). Os retrovírus caracterizam-se por terem replicação dependente de um DNA intermediário (cDNA) integrado ao genoma da célula hospedeira. O que distingue os lentivírus de outros retrovírus é a complexidade do genoma viral. Muitos retrovírus que são capazes de replicar contêm apenas três genes: *gag* (codifica as proteínas do capsídeo); *pol* (codifica as enzimas transcriptase reversa, protease e integrase) e *env* (codifica as glicoproteínas do envelope gp120 e gp41) (BARRE-SINOUSI, 1983). O genoma do HIV além destes genes essenciais, possui também seis genes adicionais que codificam proteínas que regulam o ciclo de vida. Três destes genes *tat*, *rev* e *nef* codificam proteínas essenciais para replicação, enquanto os genes *vif*, *vpu* e *vpr* codificam proteínas que participam na organização e na capacidade de produção de novas partículas virais. O gene *vif* codifica proteína que facilita a liberação e aumenta a infectividade do vírus (GARRETT, 1991). Na sua ausência as partículas virais liberadas são pouco infecciosas (SODROSKI, 1986; Fischer, 1986; Strebel, 1987). O gene *vpu* facilita o transporte das proteínas virais recém sintetizadas da célula para a partícula viral (STREBEL, 1987; KLIMKAIT, 1990). Na ausência de *vpu* ocorre o acúmulo de proteínas virais dentro da célula ou ligadas à camada interna da membrana celular. Ela possui também papel importante na patogênese e transmissão do HIV de célula para célula e de pessoa para pessoa (HASELTINE, 1991). A proteína *vpr* aumenta a velocidade de replicação do vírus. A presença desta proteína na partícula viral sugere que sua ação é anterior à transcrição do DNA proviral (COHEN, 1990). A proteína mais precoce na replicação do HIV é a proteína *nef*, sua função é inibir a atividade da Repetição Terminal Longa - LTR do

HIV e retardar sua replicação, o que favorece o estabelecimento de infecções latentes (HASELTINE, 1991).

### 1.3 - Estrutura do HIV

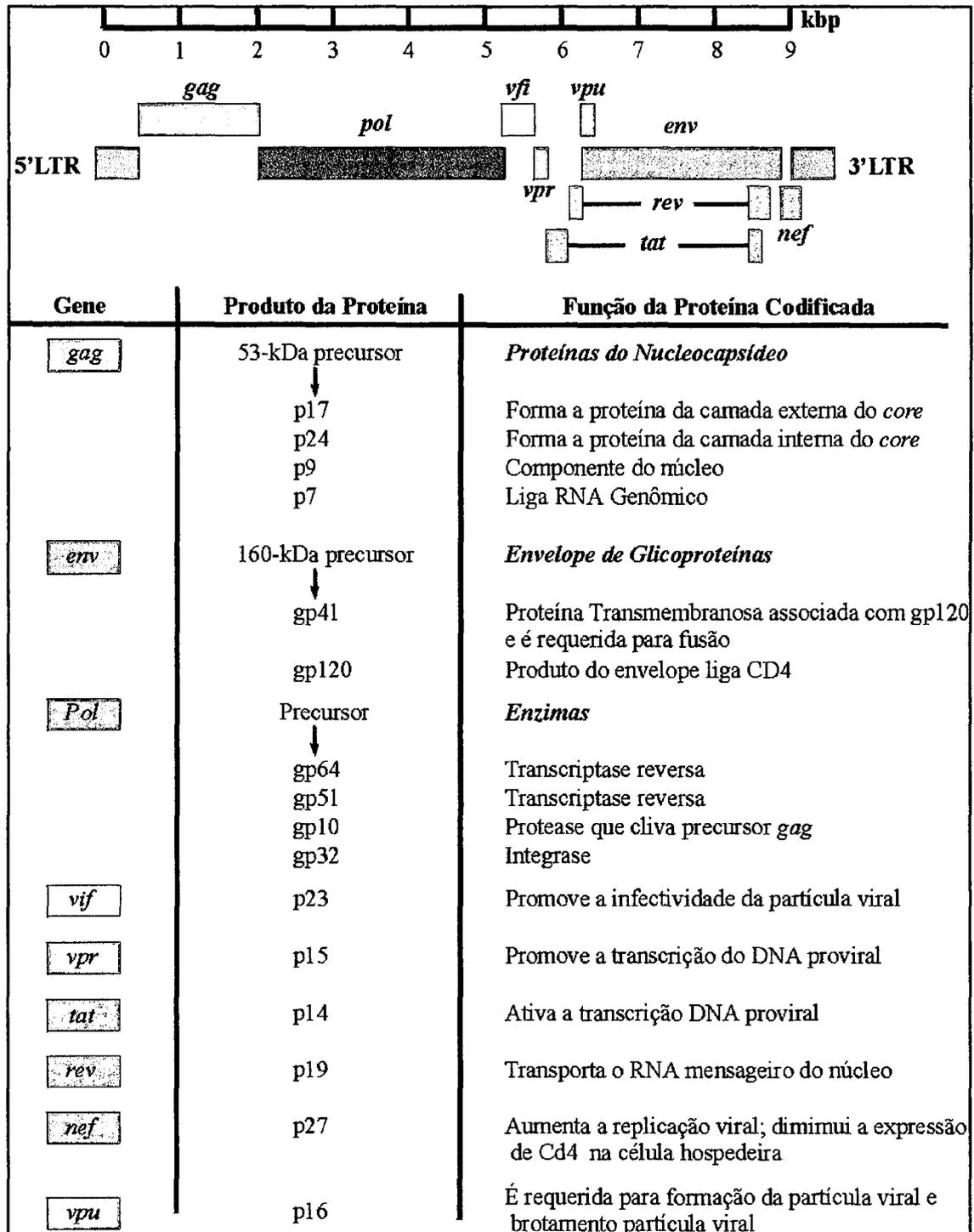


Figura 02 – Genoma do Virus HIV

Fonte: Kuby Immunology 2000.

---

A microscopia eletrônica de alta resolução permitiu revelar que o HIV apresenta formas esféricas, tendo aproximadamente 100nm de diâmetro, possuem aderido ao seu envoltório, lipoprotéico, estruturas na forma de espículas. Estas espículas são formadas por duas proteínas do envelope viral, a gp120 e gp41 (GELDERBLOM, 1987). O *core* do HIV contém quatro proteínas que resultaram da clivagem proteolítica de sua precursora (53 KD codificada pelo *gag*) pela protease viral. Estas proteínas são: p24, p17, p9 e p7. A proteína p24 é o principal componente da camada interna do nucleocapsídeo, a p17 é responsável pela estabilidade dos componentes internos e externos do vírus. A p7 junto com a p9, ligam através de uma ponte de zinco o RNA genômico formando o *core* e associado ao RNA, há ainda as proteínas transcriptase reversa, integrase e protease (GREENE, 1991).

#### 1.4 O Ciclo de Vida do HIV

Os linfócitos TCD4 e células da linhagem dos monócitos como, macrófagos, células dendríticas, células microgliais e fibroblastos, são as principais células alvo da infecção pelo HIV *in vivo* (Fauci, 1988). O HIV infecta estas células, pois elas expressam em suas membranas a molécula CD4, que funciona como receptor de alta afinidade para a glicoproteína gp120 do envelope viral (DALGLEISH, 1984; KLASTMANN, 1984).

---

A proteína CD4 está presente em altas concentrações na superfície de linfócitos TCD4 imaturo bem como nos LTCD4 circulantes e em baixas concentrações em monócitos. A ligação entre as glicoproteínas e a molécula de CD4 não é suficiente para entrada do vírus na célula. A expressão de um co-receptor CXCR4 na superfície das células T e CCR5 em monócitos é requerida para infecção pelo HIV (DRAGIC, 1996; RUIZ, 1998). O CXCR4 e o CCR5 são receptores de quimiocinas acoplados a proteínas transmembranosas que definem mais especificamente o tipo de célula alvo do HIV. A descoberta que o CXCR4 e CCR5 servem como co-receptores para o HIV em células T e monócitos respectivamente, explica porque algumas cepas de HIV infectam preferencialmente células T, enquanto outras cepas possuem maior tropismo por monócitos (RUIZ, 1998).

Outro papel importante destes receptores de quimiocinas é na replicação viral. Estudos *in vitro* mostraram que algumas quimiocinas apresentam efeito negativo sobre a replicação do HIV, por competirem pelo mesmo receptor, enquanto certas citocinas pró-inflamatórias tem efeito positivo por aumentar a expressão de receptores de quimiocinas (KUBY IMMUNOLOGY, 2000). As cepas HIV R5 monocitotrópicas são predominantemente transmitidas de pessoa para pessoa e a densidade de CCR5 na superfície da célula é determinante na progressão para AIDS. Em indivíduos que apresentam mutações no gene que codifica para este receptor, a evolução para AIDS é mais lenta. As cepas T-trópicas X4 são formadoras de sincícios e são mais comumente isoladas de pacientes em estágio tardio da doença (DEAN, 1996).

---

Depois que o vírus entra na célula o RNA viral é convertido a cDNA (provírus) por ação da transcriptase reversa (TR) e uma ribonuclease H (RH) vírus específica. A primeira fita de DNA é sintetizada pela TR enquanto a segunda fita é sintetizada pela RH, que também tem como função a degradação do RNA genômico primitivo. O produto final da transcriptase reversa (TR) é um DNA de dupla fita que contém uma seqüência conhecida como repetição terminal longa (LTR) (GREENE, 1991).

O cDNA é integrado ao genoma da célula hospedeira por ação da integrase. Uma vez integrado, o DNA viral permanece associado ao material genético do hospedeiro por longo tempo, até que haja ativação da replicação (HASELTINE, 1991).

O DNA viral é transcrito como gene celular pela RNA polimerase do hospedeiro. A transcrição do genoma produz um RNA completo que é processado para produzir vários RNA mensageiros (mRNA) contendo as seqüências gênicas *gag*, *pol* e *env*. O sítio de iniciação da transcrição está localizado na seqüência do cDNA, os LTRs (DALGLEISH, 1984). A velocidade de iniciação da transcrição é controlada pelas proteínas regulatórias celulares do hospedeiro que, afetam a velocidade de transcrição do seu genoma. Muitos vírus, incluindo o HIV, não se replicam enquanto as células não estão se dividindo, provavelmente porque os fatores de ativação celular estão ausentes (CULLEN, 1989).

Duas proteínas são fundamentais nesta etapa da replicação viral: a proteína *tat* e *rev*. A proteína *tat* reconhece a seqüência LTR 5' do DNA. A interação da *tat*

---

com o DNA aumenta a estabilidade da polimerase que está transcrevendo o gene viral, permitindo que haja a transcrição completa deste RNA. A *tat* também aumenta a frequência de iniciação do RNA. Já a proteína *rev* regula a expressão do vírus, ela é responsável pelo transporte dos mRNA do núcleo para o citoplasma, onde as proteínas regulatórias e do capsídeo serão sintetizadas (HASELTINE, 1991).

Os mRNAs são ligados à ribossomas livres no citoplasma onde são sintetizadas as proteínas precursoras. As proteínas precursoras do capsídeo se agrupam na superfície interna da membrana celular ligadas ao ácido graxo mirístico (VERONESE, 1988). O complexo proteínas precursoras – enzimas replicativas – ssRNA se agrupam e formam uma partícula fechada que “brota” através da membrana da célula hospedeira, que fornece a bicamada lipídica (GELDERBLOM, 1987).

As proteínas precursoras das glicoproteínas do envelope são sintetizadas a partir de um filamento de mRNA nos ribossomas do retículo endoplasmático rugoso (RER). Após a síntese elas se agrupam dentro do RER onde os carboidratos são adicionados (KOZARSKY, 1989). O complexo precursor das glicoproteínas do envelope entra no complexo de Golgi, onde é clivado em duas subunidades. O grupamento amino terminal é denominado gp120 (mais externo), enquanto o grupamento carboxil é denominado a gp41 (integrada ao envelope). Os carboidratos também são modificados no complexo de Golgi. As glicoproteínas se concentram na membrana da partícula viral, bem como na superfície da célula (HASELTINE, 1991).

O processo de maturação inicia com a ativação da protease que cliva as proteínas do capsídeo e os precursores das enzimas replicativas (OROSZLAN, 1990). Outro passo para maturação do HIV é a organização das glicoproteínas do envelope e a liberação da partícula viral infecciosa que estava ligada à superfície da membrana celular (GOTTILINGER, 1991).

### **1.5 Infecção das Células Alvo, Ativação do Provírus e Latência Viral**

Os passos iniciais para patogenia do HIV incluem: 1) ligação da gp 120 aos receptores CD4 das células-alvo; 2) fusão com a célula mediada pelo domínio fusogênico gp41 e o co-receptor CXCR4; 3) entrada do nucleocapsídeo contendo o genoma e as enzimas na célula; 4) liberação das enzimas e o genoma viral; 5) síntese da primeira fita DNA proviral pela ação da transcriptase reversa; 6) degradação do RNA viral, seguida da formação da segunda fita de DNA; 7) penetração do provírus no núcleo da célula-alvo e integração ao genoma do hospedeiro. Tais passos tanto podem guiar para uma infecção ativa, com replicação ativa do vírus e propagação, quanto para a latência com expressão limitada de partículas virais, na ausência de ativação celular.

Os principais passos para ativação do provirus são: 1) ativação dos fatores de transcrição com formação dos RNAs genômico (sRNAs) e RNAs mensageiros (mRNAs); 2) transporte dos RNAs para o citoplasma: 3a) síntese nos ribossomos dos precursores das proteínas virais; 3b) clivagem dos precursores nas respectivas

proteínas virais; 4) Os sRNAs e as proteínas se agrupam junto à membrana celular, onde a partícula viral é formada e as glicoproteínas são inseridas; 5) liberação da partícula viral e clivagem das proteínas virais pela protease que resulta na maturação do vírus.

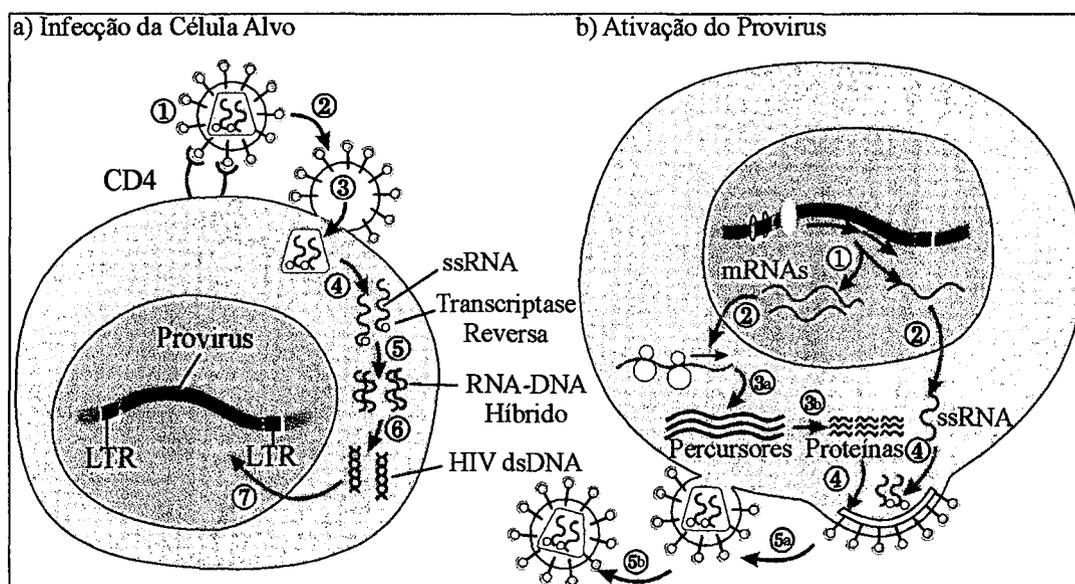


Figura 03 – Etapas da Infecção da célula hospedeira pelo HIV

Fonte: Kuby Immunology 2000.

O Principal determinante na patogenia e doença causada pelo HIV é o tropismo viral pelas células que expressam receptores CD4, principalmente linfócitos TCD4 (DALGLEISH, 1984). A depleção dos LTCD4 induzida pelo HIV resulta em disfunção imune severa, com comprometimento da função T auxiliar e de hipersensibilidade do tipo tardia (DTH). A incapacitação do sistema imune leva ao aparecimento de infecções causadas por patógenos oportunistas, caracterizando a AIDS (MONTAGNIER, 1992).

---

Além dos distúrbios imunológicos o HIV também pode promover anormalidades neurológicas, uma vez que os macrófagos e as células microgliais infectadas podem liberar substâncias neurotóxicas ou fatores quimiotáticos promovendo resposta inflamatória no cérebro (GELEZIUNAS, 1992).

A resposta imune ao HIV limita a infecção viral, mas também contribui para o desenvolvimento da patologia. Por exemplo, são produzidos anticorpos neutralizantes contra a gp120 do envelope, para impedir que haja ligação do vírus com seu receptor na célula, no entanto, quando uma partícula viral é recoberta com anticorpos, a fagocitose por monócitos/macrófagos é facilitada. Os monócitos são células que apresentam resistência à atividade citolítica do HIV e tornam-se então reservatório e meio de transporte para o vírus.

O provírus pode permanecer latente por tempo indeterminado. A transcrição pela RNA polimerase II não ocorre quando a célula está em repouso (Cullen, 1989). A ativação da célula pode ocorrer por mitógenos, citocinas (TNF- $\alpha$  ou IL1), vírus como o herpes simples (HSV), Epstein-Barr (EBV), citomegalovírus (CMV) ou vírus da hepatite B (HBV) (ROSENBERG, 1990). Muitos destes agentes estimulam a expressão de fatores de transcrição nuclear como o NF- $\kappa$ B (ROSENBERG, 1990), que normalmente está presente no citoplasma ligado à sua proteína inibitória. Com a ativação da célula, ocorre a clivagem do complexo proteína-inibidor e a migração da proteína para o núcleo. A ativação das células T induzidas por antígenos ou mitógenos está associada à transcrição de genes que codificam a IL-2 e seu receptor IL-2R. A nível molecular, este fenômeno ocorre em parte pela indução do NF- $\kappa$ B no interior das regiões promotoras dos genes IL-2 e IL-2R. A função deste

---

fator de transcrição ao ligar-se ao DNA da célula é controlar a expressão de genes envolvidos no crescimento celular bem como a IL-2 e seu receptor IL-2R (BOHNLEIN, 1988).

### 1.6 Efeito Citopático do HIV

A morte da célula na infecção pelo HIV pode ocorrer quando: uma célula produzindo grande quantidade de vírus expressa altas concentrações de receptores CD4 em sua membrana, ocorrendo então a fusão das partículas virais que estão sendo produzidas com os receptores CD4. Esta reação de fusão compromete a integridade da membrana celular e a célula morre (POPOVIC, 1984). A morte da célula infectada está diretamente relacionada com a concentração de receptores para o HIV em sua superfície, uma vez que as células que apresentam baixas concentrações destes receptores podem ser poupadas do efeito citolítico do HIV. Além disso:

- a) Indivíduos infectados por vírus mutante que não expressam a proteína *nef*, que regula a expressão de receptores CD4, possuem uma sobrevida maior;
- b) Quando ocorrer um acúmulo de cópias de cDNA não integrado ao genoma no citoplasma, que resulta no aumento da permeabilização da membrana plasmática;

- 
- c) Por ativação da apoptose que pode ser observada em vários estágios da doença e é responsável pela depleção dos LTCD4 (MEYAARD, 1992; GOUGEON, 1996);
  - d) Pelo efeito citotóxico direto das células TCD8 para reduzir as células infectadas;
  - e) Uma célula produzindo vírus pode ligar-se a várias células não infectadas via envelope de glicoproteínas, resultando na formação de sincício (célula gigante multinucleada), com meia vida curta (SODROSKI 1986; LIFSON 1986).

## 1.7 Transmissão

As formas mais comuns de transmissão do HIV são: transmissão sexual (relações homossexuais, bissexuais e heterossexuais); transmissão vertical; uso de drogas injetáveis, transfusões de sangue e de hemoderivados não testados.

As práticas sexuais foram identificadas como importantes vias de transmissão do HIV desde as primeiras investigações sobre a doença e seu agente etiológico, sendo responsável por 75% das infecções ocorridas no mundo. Está bem estabelecido que qualquer forma de intercuro sexual desprotegido no qual ocorra troca de fluídos biológicos entre os parceiros representa risco de transmissão. A presença de doenças sexualmente transmissível (DST) parece ser um cofator

---

importante para transmissão do HIV, especialmente quando elas se apresentam na forma de ulcerações nas regiões genital e perianal. Além disso, as DST levam a um estímulo constante do sistema imune favorecendo a replicação viral (KUBY IMMUNOLOGY, 2000).

O primeiro caso de AIDS, em mulher, registrado no Brasil ocorreu em 1983, em São Paulo. Em 1985 foi registrado o primeiro caso de transmissão vertical do HIV, quando a mãe infectada transmite o vírus para o seu filho (COSTA, 1994). A mãe infectada pode passar o vírus para o feto ou recém nascido das seguintes maneiras:

- a) No período pré-natal por via placentária;
- b) Durante o parto, quando pode ocorrer contato do sangue ou secreção vaginal da mãe com o sangue do recém-nascido;
- c) No pós-parto, através do aleitamento materno (KRÄUCHI, 1994; LIFSON, 1992; WHO, 1994).

Alguns estudos sugerem que a maioria dos casos de transmissão perinatal ocorreram durante o parto, por esta razão a prática da cesariana apesar de diminuir, mas não isentar dos riscos tanto a mãe quanto o bebê, é a mais indicada (WHO, 1994). As mães portadoras do HIV ou com AIDS são tratadas com anti-retrovirais antes do nascimento do bebê. Estudos realizados nos Estados Unidos em colaboração com pesquisadores franceses com gestantes que utilizaram Zidovudina (ZDV) antes do parto, revelaram uma redução de até 67,5% nas taxas de infecção por transmissão perinatal (MMWR, 1994).

Os primeiros casos de pacientes com AIDS, contaminados através de transfusões sanguíneas, foram relatados logo no início da epidemia, antes da existência de testes para identificação de doadores infectados (COHEN, 1994). A transmissão do HIV pelo sangue é a via mais eficiente. Isso se deve a carga viral presente no sangue, que é significativamente maior que em outros fluídos e porque o vírus é inoculado diretamente na corrente sanguínea. Em 1985, antes dos testes de triagem em bancos de sangue, a transmissão sanguínea foi responsável por muitos casos de AIDS, principalmente em hemofílicos (HILGARTNER, 1988).

Hoje com a disponibilidade de testes eficazes para detecção de anticorpos contra o HIV e para detecção de proteínas virais, o risco de contaminação embora não tenha sido eliminado, foi reduzido consideravelmente, podendo chegar bem próximo de zero. No Brasil é obrigatória a triagem do sangue com teste anti-HIV desde 1986.

A transmissão pelo uso de drogas injetáveis ocorre pelo compartilhamento de seringas entre os usuários. Esta prática é tida como um ritual para fortalecer os laços grupais, a chamada "roda de pico". A droga é injetada na veia e depois uma pequena quantidade de sangue é aspirada para dentro da seringa, para não deixar resquícios de droga na parede da seringa. O mesmo equipamento de injeção é utilizado por várias pessoas e ocorre verdadeiras microtransfusões de sangue entre os membros do grupo (VERONESI, 1988).

Em todos os casos relatados de HIV, os pacientes tiveram contato com sangue, sêmen, leite ou secreção vaginal de outros indivíduos infectados.

Os riscos de transmissão do HIV podem ser minimizados com medidas cautelares simples, como utilização de preservativos em relações sexuais, evitar a troca constante de parceiros sexuais, cuidados com amamentação, utilização de testes de triagem em bancos de sangue e respeito as normas de Biossegurança ao manipular material biológico.

Um fator que contribui para a disseminação do HIV é o longo tempo entre o contágio e o aparecimento dos primeiros sinais da infecção. Neste intervalo o indivíduo é aparentemente saudável e pode infectar outras pessoas.

## 1.8 Manifestações da Doença pelo HIV

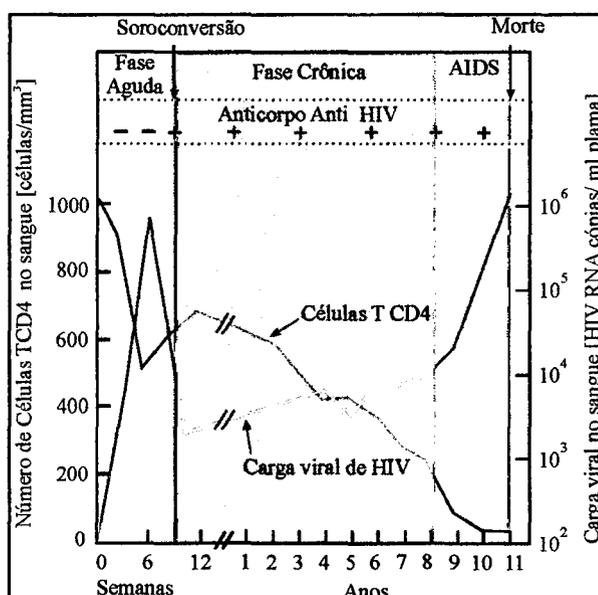


Figura 04 – Evolução típica da infecção pelo HIV

Fonte: Kuby Immunology 2000.

A história natural da infecção pelo HIV pode ser dividida em: transmissão viral, síndrome retroviral aguda, soroconversão, período de latência clínica com ou sem linfadenopatia persistente, infecção sintomática e AIDS.

A síndrome retroviral aguda é caracterizada por doença aguda semelhante à mononucleose, com viremia significativa e diminuição dos linfócitos TCD4 (DAAR, 1991). Os sintomas típicos incluem febre, cefaléia, mal estar, linfadenopatia, faringite, diarreia, náusea e vômitos. A maioria desses sintomas geralmente desaparece em poucas semanas. Nesta fase ocorre uma acentuada replicação viral com disseminação do vírus para o tecido linfóide e intensa resposta imune. Esta resposta tanto pode envolver anticorpos como a participação dos linfócitos T citotóxicos (TCD8) (ROSENBERG, 1989).

Na fase crônica ou latente geralmente os pacientes apresentam pouco ou nenhum sinal clínico da infecção pelo HIV. O principal achado clínico é linfadenopatia persistente. A biópsia de nódulo linfático revela hiperplasia folicular. Neste período da infecção o tecido linfóide serve como principal reservatório para o HIV e a carga viral, no sangue periférico, é relativamente baixa (PANTALEO, 1993 E EMBRETSON, 1993). A diminuição da carga viral neste período está correlacionada com aumento do tempo que o indivíduo permanece livre das infecções oportunistas. Contudo, o vírus inevitavelmente rompe as defesas imunes do hospedeiro, resultando em aumento da viremia e diminuição das células TCD4, o que permite a instalação de infecções oportunistas (PANTALEO, 1993).

---

A constante ativação do sistema imune leva a aumento na replicação do vírus nos linfócitos do sangue periférico e nos centros germinativos dos linfonodos. A replicação foge do controle do sistema imune e ocorre o aparecimento das primeiras manifestações clínicas. As primeiras indicações de AIDS podem ser o aparecimento de infecções fúngicas causadas por *Candida albicans*, que não respondem ao tratamento, perda de peso, febre intermitente e diarreia. Estes sintomas geralmente aparecem concomitantemente ao aumento da carga viral e diminuição das células CD4 (PANTALEO, 1993).

### **1.9 Alterações Imunológicas Associadas com a Infecção Pelo HIV**

No estágio inicial da infecção pelo HIV pode ser observado: infecção e destruição das células dendríticas nos linfonodos com alguma alteração na estrutura; aumento na síntese de imunoglobulinas A e G (IgA e IgG) e diminuição na síntese de imunoglobulina M (IgM); aumento dos níveis de algumas citocinas; redução da proliferação de células que participam da resposta imune do tipo tardia e resposta T citotóxica normal (PANTALEO, 1993).

No estágio mais avançado da infecção os padrões imunológicos comumente observados são: no tecido linfóide ocorre dano e necrose do tecido, diminuição das células dendríticas foliculares e dos centros germinativos, diminuição da capacidade de captura de antígenos com conseqüente diminuição na capacidade de ativação dos linfócitos B (LB) e T (LT); na circulação ocorre diminuição no número de células

---

TCD4 do sangue periférico, ausência de resposta imune a mitógenos ou aloantígenos, ausência de proliferação de LB monoclonal específico para o HIV, que resulta, em alguns pacientes, em níveis de anticorpos indetectáveis; eliminação da resposta imune do tipo tardia e testes cutâneos negativos, redução, mas não eliminação da atividade dos linfócitos T citotóxicos CTL (KUBY IMMUNOLOGY, 2000).

### 1.10 Diagnóstico de AIDS

O diagnóstico de AIDS inclui: infecção por micobactérias do complexo *Avium*, infecção por *Citomegalovírus*, pneumonia por *Pneumocystis carinii*. Atualmente, há uma tendência em se graduar as infecções oportunistas definidoras de AIDS, com base na sobrevida, em: leve, (candidíase esofágica, sarcoma de Kaposi cutâneo, pneumonia por *P. carinii*, tuberculose extrapulmonar); Grave (todas as outras condições definidoras de AIDS, exceto linfoma); muito grave (linfoma) (MOCROFT, 1995).

### 1.11 Diagnóstico Laboratorial

A avaliação sorológica de indivíduos suposta ou seguramente infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV-1 e HIV-2) são utilizados para identificar

---

peças infectadas, para iniciar medicações profiláticas e para tratamento específico. Para se entender adequadamente as técnicas para diagnóstico são importantes o conhecimento prévio dos antígenos virais, pois é contra eles que são produzidos os anticorpos detectados pelas várias técnicas. Por exemplo, as glicoproteínas como gp120, gp41, gp160 são produzidas em quantidades relativamente grandes, e é contra elas que se produz a maior parte dos anticorpos detectados pelas técnicas rotineiras. As proteínas do cerne como a p24, p17, p7 e p55 precursora estão presentes na partícula viral madura e são indutoras da produção de anticorpos que podem ser detectados por técnicas imunológicas.

As principais técnicas para detecção de anticorpos são:

- Ensaio imunoenzimático ou ELISA. Nesta metodologia os antígenos virais são adsorvidos a uma superfície plástica (fase sólida) e os soros sob teste após diluição adequada, são colocados sobre estes antígenos e reagem por certo tempo, quando então é colocado um conjugado que revelará o resultado da reação.
- Ensaio de imunoeletrortransferência ou *Western-Blot*. Neste tipo de teste, as proteínas do HIV-1 obtidas em cultivo são separadas por eletroforese e são fixadas em uma folha de nitrocelulose (fase sólida). Os soros são aplicados após diluição sobre o papel e a reação é revelada por meio de um complexo protéico formado por uma enzima ligada a uma antiimunoglobulina.

- 
- Imunofluorescência indireta (IFI). É uma reação clássica de IFI, onde as células infectadas pelo HIV são incubadas com soro e, posteriormente, a reação é revelada pela adição de um conjugado fluorescente. Em mãos experientes é um importante recurso confirmatório.

As principais técnicas para detecção de antígenos do HIV são:

- Reação em cadeia da polimerase ou PCR. Trata-se da amplificação do RNA viral após sua transcrição à DNA complementar e a revelação pode ser feita por eletroforese em gel, *southern-blotting* ou ELISA.
- DNA ramificado ou *branched DNA* (bDNA). A quantificação do RNA é feita sem a amplificação prévia do genoma. Para isso inúmeras sondas marcadas com enzimas que se hibridizam ao RNA viral e emitem um sinal são utilizadas, dando o aspecto de um ramo de árvore.

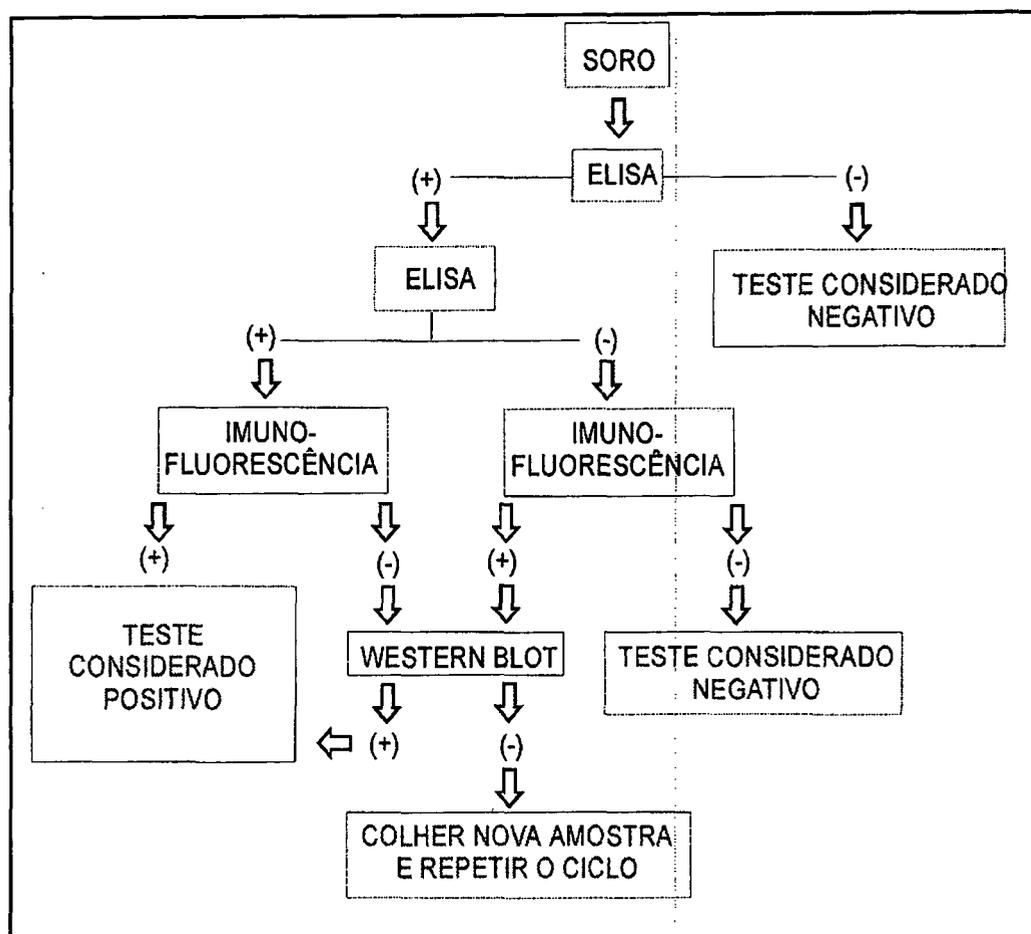


Figura 05 - Fluxograma do Ministério da Saúde para o Diagnóstico do HIV

Fonte: Ministério da Saúde, 1993

## 1.12 Apoptose

Keer et al. em 1972 utilizou o termo apoptose para se referir a alterações morfológicas que ocorriam em células com morte fisiológica de pétalas de flores e folhas de árvores. A apoptose se refere aos aspectos morfológicos de morte programada da célula, os quais são caracterizados por contração da célula, condensação da cromatina, permeabilização da membrana citoplasmática e

fragmentação da membrana com formação dos corpos apoptóticos (SAIKUMAR, 1999).

A apoptose está envolvida em muitos processos biológicos normais onde as células necessitam morrer, como por exemplo, para esculpir partes do corpo, formação das cavidades e a separação dos dedos, para eliminar estruturas que só foram úteis durante a embriogênese e manter a homeostasia. Em indivíduos adultos este fenômeno é necessário para manter a constância da massa tecidual, além disso, o sistema imune requer a eliminação de células ativadas para limitar a resposta imune. A apoptose excessiva ou insuficiente contribui para várias patologias como isquemia, doenças neurodegenerativas, doenças autoimunes, infecções virais e crescimento e regressão de tumores.

O HIV causa morte das células T-helper (WEISS, 1993). Estas células são necessárias para ativar e prevenir apoptose dos linfócitos T citotóxicos, que estão envolvidos na defesa do hospedeiro contra infecções virais (KALAMS, 1998).

A apoptose consiste em três estágios sucessivos: 1) recepção de sinais intra ou extracelulares que iniciam a morte; 2) morte da célula por ativação de proteases intracelulares; 3) remoção das células mortas por células fagocitárias (VAUX, 1996). Estes estágios são controlados por genes que são conservados durante o crescimento. A apoptose é um evento em cascata que inicia com ativação de um grupo de proteases cisteína específicas, chamadas de caspases iniciadoras, elas estão presentes na célula na forma de zimogênio. Uma vez ativada estas proteínas ativam um outro grupo de proteínas chamadas caspases executoras, que junto com

---

as endonucleases e outras enzimas fazem a desintegração da estrutura da célula (SAIKUMAR, 1999).

Existem duas formas de ativação das caspases iniciadoras, uma envolve a ligação das proteínas de morte como TNF- $\alpha$  e Fas-L com seus receptores expressos na membrana das células e a outra ocorre com a cessação dos sinais de sobrevivência celular como fatores de crescimento e algumas citocinas. Estas duas formas de ativação das caspases iniciadoras convergem para a uma via comum, que libera citocromo C, que é requerido para ativação das caspases efetoras.

A apoptose pode ser controlada por inibidores de duas origens: proteínas celulares e bloqueadores que se originam de patógenos. A primeira trata-se da Bcl-2, uma proteína cujo principal papel é a inibição das proteínas apoptóticas. O segundo inibidor é de origem exógena, e é produzido por vírus como herpes vírus e o vírus causador do sarcoma de Kaposi. Estes vírus produzem genes anti-apoptóticos que mantêm a célula viva até o fim do ciclo replicativo (THOME, 1997).

Os linfócitos apresentam uma sensibilidade aumentada ao processo de apoptose visto que depois que ocorre a ligação de um antígeno ao seu receptor, inicia-se um processo de proliferação celular muito rápido, impossibilitando o reparo de possíveis erros de transcrição, gerando assim clones de células mutantes. Por esta razão a célula comete suicídio (SELLINS, 1999).

O mecanismo envolvido no apoptose dos linfócitos é o FAS-ligante (Fas/FasL), através deste mecanismo as células T reativas são eliminadas do sangue periférico, evitando a propagação de uma reação imune (NAGATA, 1997).

Os linfócitos T citotóxico e as células NK podem induzir a morte por apoptose da célula alvo mediada por Fas/FasL ou pela liberação de granzima B, que entra na célula por canais formados pela proteína perforina e ativa as caspases iniciadoras (caspase 8) por clivagem direta ou indireta (SAIKUMAR, 1999).

As proteínas regulatórias e as proteínas estruturais são substrato para as caspases. A clivagem das proteínas regulatórias reforça a ativação do apoptose enquanto a desordem funcional das proteínas estruturais resulta na desintegração da célula (SAIKUMAR, 1999).

### **1.12 Apoptose e HIV**

A AIDS é caracterizada por aumento da morte das células T *helper* induzida pelo HIV (GOUGEON, 1998) e a depleção das células TCD4 é um marcador importante no desenvolvimento da infecção pelo HIV (CAGGIARI, 2000). As células T são particularmente sensíveis aos sinais de apoptose, uma vez que sua supressão ocorre ainda no timo como efeito da regulação da população destas células (WANG, 1994). A viremia constante e a ativação crônica do sistema imune, que é característico da infecção pelo HIV parecem ser o mecanismo primário responsável pelo acelerado processo de morte por apoptose de linfócitos em pacientes HIV positivos (GOUGEON, 1996; PANTALEO, 1995).

---

A redução progressiva da população de LTCD4 é resultado da diminuição na capacidade de geração de células T, renovação limitada, aumento na destruição de células infectadas pelos LTCD8, pelo efeito citopático do HIV, aumento na destruição das células não infectadas pela formação de sincício e principalmente pelo aumento da apoptose (SAMUELSSON, 1997). Além dos LTCD4, a apoptose pode ser observada em todas as populações de linfócitos (GOUGEON, 1996).

Vários mecanismos foram propostos para explicar o aumento da susceptibilidade para apoptose dos linfócitos de pacientes HIV positivos, e incluem ligação da gp120 com a molécula CD4 (AMEISEN, 1991), seguida pela ativação da célula após interação do antígeno com o receptor de célula T (TCR) (BANDA, 1992), alterações funcionais nas células apresentadoras de antígenos (MEYAARD, 1992) ou padrões anormais na expressão de citocinas (CLERICI, 1994).

Os LT são ativados por sinais simultâneos em seus receptores (TCR) e moléculas acessórias (CD4), seguido pela produção de interleucinas e intensa proliferação celular, no entanto se ocorrer ativação da molécula CD4 antes da ativação do receptor TCR, a célula inicia o processo de apoptose (Conhen, 1999). Em pacientes HIV positivos a gp120 (BANDA, 1992) e o complexo gp120-anti gp120 (ACEITUNO, 1997) circulantes estão envolvidos neste processo que envolve tanto células infectadas, quanto células não infectadas (AMEISEN, 1995). Em estudos realizados com LT não ativados a apoptose induzida pelo complexo gp120-anti gp120, não foi observada, indicando que os dois sinais são necessários para indução da apoptose (ACEITUNO, 1997, BANDA, 1992). Outro mecanismo importante, responsável pela apoptose de LTCD4 e outras populações de linfócitos

---

em pacientes HIV positivos é o aumento na expressão de receptores de morte Fas e TNF-R que ativam caspases (SAIKUMAR, 1999), bem como o aumento na liberação de seus ligantes por células mononucleares do sangue periférico, estimulado pela ligação do HIV com receptores CD4 e a constante ativação do sistema imune (MORETTI, 2000).

O principal fator que contribui para a patogênese do HIV é a habilidade do vírus para suprimir o sistema imune (SHEARER, 1986; LANE, 1985). Esta supressão torna o paciente susceptível a infecções oportunistas, que são freqüentemente responsáveis pela morbidade e mortalidade do indivíduo HIV positivo. O mecanismo pelo qual o HIV compromete o sistema imune é através da eliminação dos LTCD4, que ocorre não somente pela infecção direta destas células pelo HIV, uma vez que um pequeno número destas células encontram-se infectadas tanto no sangue periférico quanto nos órgãos linfóides (FAUCI, 1988), mas através da ativação por complexos Ag-Ac (LYERLY, 1987). Quanto mais rápida a progressão para AIDS maior o grau de apoptose comparado com a progressão lenta para AIDS. A ativação do sistema imune foi observada em todos os estágios da infecção, tanto no tecido linfóide quanto nos linfócitos do sangue periférico e isto reflete uma hiperplasia folicular e aumento na expressão dos marcadores de ativação como resultado da replicação viral constante (GOUGEON, 1996).

Em pacientes com AIDS aspectos compatíveis com aumento da morte induzida por apoptose, como diminuição no número de células e atrofia de tecidos podem ser observados na medula óssea, músculo e cérebro. Na medula óssea a apoptose é um processo regulatório normal da população de células, em resposta a

---

diminuição de fatores de crescimento como IL-3, fator estimulador de crescimento de colônia monocítica granulocítica (GM-CSF) ou eritropoetina. O aumento da apoptose destas células em pacientes com AIDS é mediada pela interferência do HIV com os sinais de crescimento e proliferação celular, o que explica a redução de células precursoras na medula óssea, que resulta na freqüente citopenia (AMEISEN, 1991).

O aumento no processo de apoptose dos linfócitos de pacientes HIV positivos tem sido exaustivamente estudado e comprovado cientificamente por vários grupos de pesquisadores.

No entanto, a avaliação da apoptose como marcador laboratorial da evolução da infecção pelo HIV e monitoramento da terapia anti-retroviral (TARV) não tem sido utilizado na rotina clínica e laboratorial, contudo, em trabalhos de pesquisa este parâmetro tem sido utilizado e mostrou ter aplicação na rotina de avaliação de pacientes HIV positivos.

### **1.13 Anemia e Metabolismo do Ferro**

Os eritrócitos são os elementos celulares sangüíneos que se encontram em maior número no sangue periférico. Sua principal função é o transporte de oxigênio ligado a hemoglobina para os tecidos, e a remoção do gás carbônico, bem como o transporte de micronutrientes (ERSLEV, 1995).

O número de eritrócitos totais é regulado pela medula óssea, e sua reposição é induzida por agentes específicos, citocinas e eritropoetina, que atuam mediando a liberação de fatores estimuladores da formação, crescimento e diferenciação de colônias (CAVIL, 1988).

A anemia é uma complicação freqüente no curso da infecção pelo HIV (SCADDEN, 1989). Estudos revelaram que de 10 a 20% dos indivíduos soropositivos apresentam anemia de perfil normocítico e normocrômico, podendo ser decorrente de alterações na forma dos eritrócitos (TREACY, 1987). Tais alterações no formato das células vermelhas faz com que as mesmas sejam retidas nos sinusóides do baço, onde são fagocitadas pelos macrófagos locais ou sofram hemólise intravascular precocemente (ERSLEV, 1995).

A menor produção de células sanguíneas, dentre elas os eritrócitos, foi constatada em mais de 50% dos indivíduos com AIDS (SPIVAK, 1992). Este comprometimento na síntese de eritrócitos pode ser induzida pela diminuição na síntese de citocinas. O estímulo crônico do sistema imune que resulta na liberação de citocinas inibitórias como IFN- $\gamma$  (interferon- $\gamma$ ) é o outro mecanismo responsável pelo quadro anêmico em pacientes HIV positivo. Segundo Fuchs *et al.*, 1993 o interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), liberado por monócitos e células ativadas possuem a capacidade de inibir a eritropoetina (EPO), e o efeito inibitório sobre as células precursoras eritróides pode ser parcial, uma vez que a administração de altas doses de eritropoietina é capaz de reverter à anemia. A redução na resposta à EPO está relacionada com anemia (SPIVAK, 1989) e diminuição da hemoglobina em pacientes

HIV positivos, embora haja um aumento nos níveis de EPO nestes pacientes (RARICK, 1991).

Um dos parâmetros utilizados para estimar a quantidade de eritrócitos no sangue circulante é o hematócrito. Este dado representa a proporção entre a parte sólida e a parte líquida do sangue. A forma, o tamanho e o número de eritrócitos podem influenciar na determinação dos valores percentuais do hematócrito (PEARSON, 1984).

Outro parâmetro laboratorial no monitoramento do quadro anêmico é a hemoglobina que é componente dos eritrócitos, e, é veículo de transporte de oxigênio para os tecidos. A hemoglobina proveniente da hemólise intravascular é liberada no plasma e liga-se a haptoglobina, sendo então este complexo removido após 10 a 30 minutos pelo sistema monocítico fagocitário. A diminuição nos níveis de hemoglobina está significativamente associado com a progressão para AIDS (POLK, 1987).

Em situações em que há destruição extravascular dos eritrócitos ocorre liberação de seus constituintes, entre eles uma pequena quantidade de lipídeos, proteínas, ferro e heme. As proteínas e lipídeos são reprocessados pelas suas respectivas vias catabólicas, e o heme é clivado pela enzima heme oxigenase em ferro e biliverdina. O ferro é reaproveitado para a síntese de novas moléculas de hemoglobina e a biliverdina é catabolizada, e, posteriormente eliminada através da urina ou pelas fezes (MCCOUBREY, 1992).

---

O ferro é um elemento essencial para todas as células vivas e participa de várias vias metabólicas, como a eritropoese (HOLLÁN, 1993). No organismo, o ferro encontra-se normalmente ligado a proteínas como a hemoglobina, mioglobina e transferrina (BAUER, 1986). Após a absorção pela mucosa intestinal, na forma de  $Fe^{+++}$ , o ferro passa à circulação ligado a uma proteína transportadora denominada transferrina. Após a ligação dos átomos de ferro a transferrina, a proteína transporta o ferro aos eritroblastos da medula óssea ou a outros tecidos, onde ele ficará armazenado ligado a duas proteínas, ferritina e hemossiderina (ERSLEV, 1995).

A ferritina é a principal forma de armazenamento de ferro no organismo, tendo ainda o papel de controle do mecanismo de absorção de ferro. Quanto maior a necessidade de ferro no organismo, menor a quantidade de ferritina no citoplasma das células intestinais, facilitando assim a passagem do ferro para a circulação. Quando os níveis séricos de ferro estão normalizados, a ferritina citoplasmática aumenta, retendo o ferro nestes sítios e desta forma evitando um aumento desnecessário deste na circulação (LORENZI, 1992). O comportamento da ferritina em pacientes com AIDS, é semelhante ao das proteínas de fase aguda, que apresentam elevação de seus níveis séricos em decorrência da maior síntese hepática (AMEGLIO, 1993).

## 1.14 Plaquetas

As plaquetas são resultantes da fragmentação do citoplasma do megacariócito, medem aproximadamente 2 a 4 micras de diâmetro e apresentam forma discóide (ERSLEV, 1995).

As plaquetas sangüíneas, além do importante papel que exercem na hemostasia, estão envolvidas na resposta imune à inflamação e apresentam receptores para imunoglobulina G (ROITT, 1996). A diminuição na contagem de plaquetas é uma das primeiras alterações observadas nos indivíduos infectados pelo HIV (RATNOFF, 1983; WALSH, 1985). Perkocha em 1988 descreve que a trombocitopenia é potencializada com a progressão da infecção pelo HIV. No entanto, esta redução do número de plaquetas com a progressão da infecção, não leva o indivíduo ao sangramento, exceto nos casos onde a contagem total de plaquetas está abaixo de  $50.000/\text{mm}^3$ , situação esta em que as possibilidades de ocorrer hemorragia estão aumentadas.

A trombocitopenia observada pode ser decorrente da ação direta do vírus na medula óssea, de sua interferência na maturação do megacariócito ou na indução de alterações no sistema imune, o que levaria a uma produção de anticorpos antiplaquetas (SPADA, 1998).

## 1.15 Leucócitos

Os leucócitos ou células brancas são elementos figurados encontrados no sangue, e são diferenciados morfológica e funcionalmente em dois grandes grupos: os granulócitos que são células que apresentam granulações citoplasmáticas e os agranulócitos onde não são verificadas estas granulações.

Os granulócitos são produzidos na medula óssea, a partir de células precursoras por um processo de proliferação e maturação celular. São divididos em três grupos: os neutrófilos, os eosinófilos e os basófilos. Todas as linhagens seguem uma seqüência de desenvolvimento: mieloblasto, pró-mielócito, mielócito, metamielócito, bastonete, segmentado, no entanto, as linhagens basofílica e eosinofílica apresentam granulações que as diferenciam da linhagem neutrofilica (GOLDE, 1990). Em indivíduos HIV positivos geralmente o número de neutrófilos encontra-se diminuído, em pacientes assintomáticos (ZON, 1988), enquanto, os eosinófilos não apresentam variações (TREACY, 1987). Nenhuma referência é feita sobre a participação dos basófilos nesta infecção.

Os leucócitos agranulócitos são encontrados fisiologicamente no sangue periférico, sob duas formas, os monócitos e os linfócitos. Os monócitos são células circulantes consideradas ainda não totalmente maduras, que só atingem o estágio final de desenvolvimento ao deixarem a corrente circulatória para se fixarem nos tecidos, transformando-se em macrófagos tissulares ou das cavidades serosas (LORENZI, 1992). Os monócitos/macrófagos uma vez ativados promovem a defesa

---

do organismo, através da remoção do agente causal, seja no sangue ou em qualquer dos tecidos onde este se instalar (ABBAS, 2000). A contagem absoluta do número de monócitos circulantes encontra-se até 30% reduzido em indivíduos clinicamente saudáveis em relação a pacientes que apresentem distúrbios infecciosos (SMITH, 1984).

Os linfócitos originam-se de células indiferenciadas da medula óssea, passando por poucas fases intermediárias até a célula madura (LORENZI, 1992). Os linfócitos são divididos em três populações: células B, células T e células que não apresentam marcador específico tanto para células B quanto para células T que são conhecidos como linfócitos granulares grandes ou células destruidoras naturais (*natural killer*, NK) (KUBY IMMUNOLOGY, 2000).

Os linfócitos T (LT) são derivados da *stem cells* da medula óssea, e se desenvolvem principalmente no timo, onde ocorre a maturação dessas células, daí a designação de Linfócitos T (ABBAS, 2000). Ao contrário dos LB, os LT não reconhecem antígeno livre. Os receptores de LT (LTR) somente reconhecem o antígeno quando ele está ligado ao complexo de histocompatibilidade maior (MHC). Os LT assemelham-se morfológicamente aos LB, porém podem ser distinguidos destes últimos pela presença de marcadores antigênicos de superfície celular específicos. Estes marcadores incluem o TCR, semelhante às imunoglobulinas dos LB, e o complexo CD3. Este último está presente em todos os LT e atua como um transdutor de sinais após a ligação do antígeno ao TCR, resultando em ativação da célula T e produção de interleucina (IL-2) e seu receptor IL-2R. Os LT podem ser subdivididos em LT *helper* (CD4) e LT citotóxico (CD8). As células T que expressam

---

a molécula CD4 reconhecem antígenos ligados ao MHC II, enquanto as células T que expressam CD8, reconhecem antígenos ligados ao MHC I. A razão CD4/CD8 é de 2:1 no sangue periférico de um indivíduo clinicamente saudável, no entanto ela pode apresentar-se significativamente alterada em síndromes de imunodeficiência, doenças autoimunes e outras desordens. A principal função dos LTCD4 é a produção e secreção de várias citocinas, que ativam as células T, LB e outras células que participam da resposta imune. Os LT *helper* ainda podem ser subdivididos em T1, que produzem citocinas pró-inflamatórias e ativam certas células T e macrófagos, e T2 que ativam LB e a resposta imune mediada por anticorpos (STITES, 2000).

As células TCD8 incluem as células T citotóxicas (LTC) e as células supressoras. A resposta dos LTCD8 é iniciada quando precursores destas células são estimulados pela ligação de TCR e CD8 com peptídeo antigênico sobre a molécula MHC I e pela ação concomitante da IL-2. Os LTCD8 eliminam as células alteradas por infecção viral ou tumor através da liberação de granzima B, uma esterase e de perforina, uma proteína formadora de poros na membrana da célula-alvo (PARHAM, 2000).

Os linfócitos B (LB) são produzidos preferencialmente na medula óssea e lá permanecem até alcançar seu primeiro estágio de maturação (MONDELLI, 1990). Os LB são responsáveis pela síntese das imunoglobulinas, geralmente sob o controle da célula reguladora T (ROITT, 1996). A síntese de imunoglobulinas inicia após a interação entre o antígeno e as moléculas de imunoglobulinas ligadas a membrana da célula B, bem como após a interação do LB com macrófagos e LT.

---

Após este processo os LB se dividem rapidamente e diferenciam-se em células plasmócitos, que sintetizam e secretam anticorpos (ABBAS, 2000).

Em indivíduos soropositivos para o HIV, assintomáticos, é freqüente a contagem de linfócitos T CD<sub>4</sub> estar diminuída, bem como a relação CD<sub>4</sub>/CD<sub>8</sub> (DE SHAZO, 1983; MENITOVE, 1983).

Em estudos realizados com indivíduos soropositivos para o HIV, homossexuais, assintomáticos, foi observada linfopenia absoluta em 30% dos indivíduos. Em indivíduos com infecções oportunistas o número de casos aumentou para 50 a 70 % (DELACRETAZ, 1993). Estudo realizado no ano de 1998, por Spada *et al.* demonstrou uma queda significativa na contagem destas células com a progressão da infecção.

### **1.16 Imunoglobulinas**

As imunoglobulinas (Ig, anticorpos), são glicoproteínas produzidas pelos linfócitos B e pelos plasmócitos, em resposta a estímulos antigênicos e podem ser consideradas como receptores primários para os antígenos. Cada indivíduo pode sintetizar de 10<sup>9</sup> a 10<sup>11</sup> milhões de diferentes moléculas de imunoglobulinas, cada qual com distinta especificidade de ligação a antígenos (ROITT, 1996). As imunoglobulinas circulantes são moléculas efetoras da imunidade humoral, localizando, neutralizando e eliminando antígenos produzidos (ABBAS, 2000).

---

As várias classes de imunoglobulinas ou isótopos são distingüidas por uma única seqüência de aminoácidos na cadeia pesada que confere a estrutura e função específica. De acordo com as diferenças estruturais e propriedades funcionais as imunoglobulinas são classificadas em: IgA; IgD; IgE; IgG e IgM (MORGAN, 1987; KUBY IMMUNOLOGY, 2000).

A imunoglobulina G é a classe mais abundante no soro, constituindo cerca de 80% das imunoglobulinas séricas e pode ainda ser dividida em quatro subclasses. A IgG é produzida predominantemente durante a resposta imune secundária e tem a capacidade de atravessar a barreira placentária, conferindo a imunidade do recém nascido (KUBY IMMUNOLOGY, 2000).

A imunoglobulina M corresponde de 5% a 10% das imunoglobulinas totais e sua concentração média no soro é de 1.5 mg/ml. A IgM é secretada por células plasmócitos como uma estrutura pentâmera, com dez sítios de ligação para antígenos. É a primeira classe de imunoglobulinas produzidas em resposta primária a antígenos, e é também a primeira imunoglobulina sintetizada por neonatos (KUBY IMMUNOLOGY, 2000).

Devido a sua estrutura pentamérica, a IgM é capaz de ligar-se a antígenos multidimensionais como, partículas virais e eritrócitos, sendo que o número de moléculas de IgM requeridas para neutralizar um antígeno viral, por exemplo, é menor que o número de moléculas de IgG. A IgM também é mais eficiente do que a IgG na ativação do sistema complemento. Devido ao seu tamanho a IgM não se

---

difunde por tecidos e fluidos intersticiais e não atravessa a membrana pacentária (ABBAS, 2000).

A IgA constitui apenas 10% a 15% das imunoglobulinas totais no soro, no entanto ela é a classe predominante nas secreções como, leite materno, saliva, lágrimas, mucosas dos brônquios, trato geniturinário e trato digestivo. A IgA secretória tem papel fundamental na defesa contra microrganismos patogênicos nestes locais, principalmente por que eles são porta de entrada para microorganismos. A IgA pode apresentar estrutura polimérica, que confere a ela a capacidade de ligar-se a antígenos com múltiplos epitopos, bloqueia a ligação do antígeno com a célula da mucosa, inibe a colonização e proliferação de vírus e bactérias (ABBAS, 2000).

A síntese dos anticorpos é regulada pelos linfócitos T, que influenciam na função de muitas outras células do sistema imune, incluindo a função dos linfócitos B e macrófagos.

Nos indivíduos HIV positivos constata-se diminuição do número de LTCD4, freqüentemente ocasionando diminuição na relação LTCD4/LTCD8, linfopenia absoluta, hipergamaglobulinemia e hipersensibilidade do tipo tardia diminuída (FARTHING, 1989), alterações estas que comprometem ainda mais o quadro clínico do paciente imunodeprimido.

---

### 1.17 Beta 2 Microglobulina

A  $\beta 2$  microglobulina ( $\beta 2M$ ) é um pequeno polipeptídeo que forma a cadeia leve das moléculas do complexo de histocompatibilidade maior da classe I (MHC I), presentes na superfície de numerosas células nucleadas, incluindo os linfócitos (ABBAS, 2000). A  $\beta 2M$  é liberada no soro com a destruição da célula ou a renovação de sua membrana; a seguir, é filtrada pelo glomérulo renal, e mais de 99% são reabsorvidos e metabolizados pelos túbulos renais proximais. Cerca de 50% da  $\beta 2M$  no soro provém dos linfócitos. Por esta razão, os níveis de  $\beta 2M$  foram utilizados como marcador inespecífico da proliferação ou renovação dos linfócitos, como as que ocorrem na estimulação imunológica ou em distúrbios linfoproliferativos. Como as células TCD4 são afetadas na infecção pelo HIV, a  $\beta 2M$  apresenta níveis elevados em pacientes HIV positivos e está correlacionada com a progressão da infecção. Então a  $\beta 2M$  além de ser um bom marcador de progressão para AIDS, sua dosagem também pode ser utilizada como marcador de destruição de células TCD4, estando inversamente relacionada com a contagem de LTCD4 (TSEUKAS, 1994).

---

## 1.18 Terapia Anti-Retroviral

A meta da terapia anti-retroviral é bloquear a transcrição do RNA viral e a clivagem das proteínas do HIV que garantem a sua infectividade. Apesar dos avanços terapêuticos, problemas como resistência viral, latência viral nos reservatórios e efeitos tóxicos dos medicamentos que dificultam a adesão ao tratamento tem sido freqüentemente observados. Nos últimos anos houve um progresso significativo no desenvolvimento de fármacos anti-retrovirais (ARV). Hoje há dezesseis medicamentos sendo utilizados no bloqueio da replicação do HIV-1. A terapia combinada aumentou a qualidade e a sobrevida de muitas pessoas infectadas pelo HIV (D'SOUZA, 2000).

Em pacientes HIV positivos, o aumento na susceptibilidade da morte celular por apoptose é observado em células CD4 e CD8 e está correlacionado com o estado geral de ativação do sistema imune. Com a terapia anti-retroviral eficiente, observa-se diminuição na susceptibilidade para apoptose bem como diminuição na ativação do sistema imune resultando em aumento da proliferação e redistribuição dos linfócitos no sangue periférico (CANNAVO, 2001; ROEDERER, 1998).

Durante a infecção inicial os níveis de RNA-viral encontram-se diminuídos em mulheres quando comparados com homens, contudo a velocidade de progressão para AIDS não é diferente (FARZADEGAN, 1998). A velocidade de progressão para AIDS não difere, a despeito da baixa carga viral observada em

---

mulheres. O início do tratamento com Anti-retrovirais é determinado pela carga viral e o valor não difere de acordo com o sexo (STERLING, 2001).

De acordo com as diretrizes já estabelecidas a corrente terapia anti-retroviral combina dois inibidores da transcriptase reversa e um inibidor da protease, esta combinação é altamente eficaz na redução da viremia e no aumento da contagem de LTCD4. O aumento na população de LTCD4 ocorre pela geração de novas células T (HO, 1995; WEI, 1995) e/ou aumento na liberação destas células dos linfonodos para o sangue periférico (BUCY, 1999; ROSEMBERG, 1989). Os estudos sobre repopulação de LTCD4 em pacientes infectados pelo HIV após a terapia anti-retroviral, têm mostrado que o aumento do número de LTCD4 após a TARV ocorre de forma bifásica, sendo que a maioria das células é originada pela proliferação dos LT em resposta a ativação das células T de memória e a outra parte é originada por um pequeno aumento das células progenitoras (AUTRAN, 1997; PAKKER, 1998). A recuperação do sistema imune depois da terapia anti-retroviral é mais eficaz em crianças, quando comparada com adultos e está relacionada ao fato que as crianças apresentam atividade do timo (FRANCO, 2000).

Muito já se sabe sobre a replicação do HIV, desde sua fusão com a membrana da célula hospedeira até a liberação de partículas virais maduras e os fármacos utilizados atuam em vários passos da replicação. Estes fármacos incluem inibidores da transcriptase reversa e da protease. Os inibidores da transcriptase reversa podem impedir que o vírus infecte novas células, mas não interfere na replicação do genoma do HIV que está integrado ao genoma do hospedeiro. Para a seleção de um regime anti-retroviral é necessário levar em consideração o perfil de

---

cada paciente, incluindo os valores basais de carga viral, contagem de CD4 e aspectos clínicos. Os benefícios do tratamento com ARV também deve ser relacionado a outros fatores como efeitos adversos, tolerância, interações entre fármacos, custos e o surgimento de variantes resistentes, que podem causar impacto na estratégia de tratamento (STASZEWSKI, 2001).

### **1.18.1 Fármacos Anti-Retrovirais Para Tratamento da Infecção Pelo HIV**

#### **Inibidores análogos nucleosídeos da transcriptase reversa**

- Azidotimidina (AZT) (Zidovudina)
- Didesoxicidina (ddC) (Zalcitabina)
- Didesoxinosina (ddI) (Didanosina)
- D4T (Estavudina)
- 3TC (Lamivudina)

#### **Inibidores não-nucleosídeos da transcriptase reversa**

- Nevirapina
- Delavirdina

### Inibidores da protease

- Saquinavir
- Ritonavir
- Indinavir
- Nelfinavir

### Tratamento de combinação

- Indinavir/AZT/3TC
- Ritonavir/AZT/3TC
- Nelfinavir/AZT/3TC
- Nevirapina/AZT/ddI
- Nevirapina/Indinavir/3TC

---

### 1.18.1.1 Zidovudina

Foi primeiro desenvolvida como agente antineoplásico em 1964 (HORWITZ, 1964). Sua ação antiviral foi descoberta em 1974, quando foi utilizada no tratamento de leucemia causada por vírus (OSTERTAG, 1974) e anti HIV em 1985 (FURMAN, 1986). A ZDV (antigo azidotimidina – AZT) é um análogo nucleosídeo da timidina, é bem absorvida pelo trato gastrointestinal, sofre glucoronização no fígado e se difunde através da membrana celular (ZIMMERMAN, 1987), é convertida a zidovudina trifosfato, que é sua forma ativa, capaz de impedir o alongamento da fita de DNA viral (LARDER, 1989). A zidovudina monofosfato cuja concentração intracelular é maior do que o trifosfato, também pode inibir a ribonuclease H da transcriptase reversa do HIV (TAN, 1987).

### 1.18.1.2 Uso Clínico

Um estudo realizado com 282 pacientes em estado avançado da infecção pelo HIV demonstrou que, 1500 mg/dia de ZDV aumentou significativamente a sobrevivência destes pacientes quando comparados com pacientes que receberam placebo (RICHMAN, 1987). Além do aumento da sobrevida, os pacientes tratados com ZDV apresentaram menor incidência de infecções oportunistas, aumento de peso, aumento da capacidade física, bons resultados em testes cognitivos, aumento

---

na contagem de linfócitos TCD4 e reatividade nos testes de hipersensibilidade (RICHMAN, 1987). A dose diária recomendada é de 500 a 600 mg/dia. A meia vida é de aproximadamente uma hora no plasma e a meia vida intracelular da forma ativa é de três horas (FURMAN, 1986; YARCHOAN, 1989). Por ser de fácil administração a posologia indicada é de 200 mg a cada oito horas.

O que torna a transcriptase reversa do HIV sensível a ZDV é a pouca sensibilidade desta enzima, que permite que ela incorpore nucleotídeos que não são do HIV, impedindo com isso o alongamento da cadeia de DNA durante a transcrição do RNA viral. A mesma característica que torna o HIV sensível a ZVD também promove o desenvolvimento de resistência. Especialmente, a taxa elevada de erros da transcriptase do HIV cria mutações extensas e promove o desenvolvimento de cepas resistentes (LARDER, 1989). É importante salientar que a ZDV previne a infecção pelo HIV em células susceptíveis, porém não impede a expressão do HIV em linhagens de células infectadas (POLI, 1989). A ZDV também é utilizada para impedir a transmissão materno-fetal do HIV. Ela é bem tolerada durante a gravidez e não causa má formação fetal nem nascimento prematuro (CONNOR, 1994).

### **1.18.1.3 Efeitos Colaterais**

A anemia e a leucopenia são complicações comuns com o uso prolongado da ZDV. O uso de eritropoetina e fatores estimuladores de colônias granulomonocítica reduz a supressão da medula óssea causada pela ZDV (GROOPMAN, 1990). A terapia prolongada também pode causar elevação dos

---

níveis séricos de creatina quinase, miopatia, caracterizada pela inibição da replicação do DNA mitocondrial, que muitas vezes não é distinguida da miopatia causada pelo próprio HIV (DALAKAS, 1990).

#### 1.18.1.4 Resistência do HIV a ZDV

Alguns problemas estão relacionados ao uso prolongado da ZDV e vários fatores podem contribuir para a diminuição da eficácia terapêutica. Dentre eles está a aquisição de resistência a ZDV pelo HIV (LARDER, 1989), a toxicidade, a diminuição na transformação da zidovudina em zidovudina trifosfato, aumento da virulência do HIV e aumento da capacidade do vírus em “driblar” o sistema imune e aumentar a replicação. A progressão da infecção foi relacionada com o aparecimento de cepas virais indutoras de sincício, cujo envelope apresentou alterações em suas glicoproteínas (CHENG-MAYER, 1990). A resistência ocorre pela substituição de um aminoácido na transcriptase reversa do HIV. Esta alteração genética é lenta e progressiva e a maior resistência ocorre em vírus que apresentam quatro ou cinco substituições. A concentração da zidovudina necessária para inibir a replicação desta cepa de alta resistência *in vitro* é cem vezes maior do que a usual. Os pacientes em estado avançado da infecção desenvolvem resistência mais rapidamente do que os pacientes com sintomas precoces, que ocorre cerca de doze meses após o início do tratamento e a dose da ZVD não está relacionada com o grau e a velocidade de desenvolvimento de resistência (RICHMAN, 1990).

### 1.18.2 Didanosina

A Didanosina (ddl) foi o segundo agente anti-HIV aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA). O ddl é uma purina dideoxiadenosina, um pró-fármaco que é transformado, dentro da célula, na sua forma ativa a dideoxiadenosina trifosfato. A ddl bloqueia a síntese do DNA pró-viral por inibição competitiva da transcriptase reversa ou pela inserção de um nucleosídeo que não é do HIV à cadeia de DNA recém formada, impedindo o seu alongamento (YARCHOAN, 1989). A administração é por via oral, na forma de tabletes mastigáveis ou pó, ambas as formas são tamponadas. A meia vida no plasma é de meia hora, enquanto a meia vida intracelular é de doze horas, permitindo um regime de duas administrações diárias (YARCHOAN, 1989).

#### 1.18.2.1 Uso Clínico

A Didanosina foi inicialmente aprovada para o tratamento de pacientes com infecção avançada que apresentavam intolerância a ZDV ou quando o tratamento com ZDV não era eficaz. Os pacientes tratados com ddl apresentavam aumento de peso, testes de hipersensibilidade positivos, aumento na contagem de LTCD4 e diminuição na carga viral. A Didanosina é mais eficiente em pacientes que receberam tratamento prévio com ZDV (8 a 16 semanas), isto indica que o

tratamento com ZDV/ddI pode ser benéfico depois de um certo período de tratamento com ZDV em pacientes com doença avançada, embora o melhor tempo para iniciar a terapia associada não esteja ainda bem estabelecido (HIRSCH, 1993).

#### **1.18.2.2 Efeitos Colaterais**

Os efeitos colaterais diferem consideravelmente dos causados pela ZDV e eles incluem, neuropatia periférica, pancreatite, dor abdominal, elevação dos níveis séricos de amilase, cefaléia e diarreia. Pacientes que apresentam disfunção hepática e renal são considerados pacientes de risco.

#### **1.18.2.3 Resistência do HIV a Didanosina**

A resistência é observada após o uso prolongado de ddI, embora o grau de resistência é menor que em relação a ZDV. O que confere a resistência é a substituição de aminoácidos da transcriptase reversa do HIV (ST CLAIR, 1991).

---

### 1.18.3 Zalcitabina (DdC)

É usada em associação com ZDV no tratamento de pacientes que apresentam sinais de piora clínica e imunológica e com contagem de LTCD4 menor que  $300/\text{mm}^3$ . Como a ZDV e ddl, a ddC também necessita de transformação intracelular em sua forma ativa trifosfato. A meia vida no plasma é vinte minutos e a meia vida intracelular é de duas horas. Os pacientes com infecção avançada tratados com ddC, apresentaram ganho de peso, diminuição nas concentrações séricas de antígeno p24 e aumento transitório na contagem de LTCD4 (YACHOAN, 1988). Após seis meses de tratamento o paciente pode apresentar neuropatia periférica e estomatite.

### 1.19 Inibidores da Protease

A protease do HIV é essencial para o processamento das proteínas do *core*, que resulta na formação da partícula infecciosa. Partículas não infecciosas com características morfológicas imaturas e reduzida atividade da transcriptase reversa são formadas quando ocorre mutação ou inibição da protease (HASELTINE, 1991).

Os regimes terapêuticos contendo inibidores da protease tem contribuído substancialmente para retardar a progressão da AIDS e aumentar a sobrevivência de pacientes HIV positivos. Porém vários problemas podem limitar o seu uso por

---

tempo prolongado. Dentre eles estão: pouca tolerância, formação de metabólitos tóxicos, interações com outros fármacos dado a indução ou inibição do citocromo P<sub>450</sub> e adesão incompleta (STASZEWSKI, 2001). O saquinavir, o indinavir e o ritonavir são fármacos cujo mecanismo de ação consiste na interação com o sítio ativo da protease inibindo sua ação. A combinação de um inibidor da protease com ZDV e um segundo análogo nucleotídeo pode reduzir os níveis de RNA viral a níveis indetectáveis, além de diminuir a probabilidade do desenvolvimento de resistência viral. Um fator limitante no uso desta classe de anti-retrovirais é a lipodistrofia (CAAR, 1999).

### **1.20 Terapia Combinada**

A associação de dois ou mais ARV tem sido correntemente utilizada em função de problemas relatados como ineficácia da monoterapia, resistência viral e toxicidade. A toxicidade que pode ocorrer com a monoterapia é devido à utilização de altas doses de medicamento para se alcançar um tratamento efetivo, já a combinação com mais fármacos, a concentração necessária para inibir a replicação é menor, reduzindo assim os riscos de efeitos tóxicos. O efeito sinérgico dos fármacos antivirais reduz a dose requerida de cada fármaco para inibição do vírus, embora as combinações possam atuar em células (linfócitos ou macrófagos) e tecidos diferentes (cérebro ou tecido linfóide). O aparecimento de variantes resistentes também podem ser limitadas com uma combinação adequada. Vários

---

estágios do ciclo replicativo do HIV são ao mesmo tempo alvo de um regime terapêutico (por exemplo, zidovudina mais inibidor da protease), bem como a mesma etapa de replicação pode ser inibida por dois diferentes fármacos, com o mesmo mecanismo de ação (zidovudina mais didanosina) em outro regime terapêutico (CHOW, 1993). O tratamento com associações tem mostrado aumento na contagem de CD4 quando comparado com a monoterapia com ZDV. A associação de ZDV com zalcitabina é recomendada para o tratamento de doença avançada. Também a combinação de fármacos antivirais com agentes profiláticos contra patógenos oportunistas tem sido rotineiramente utilizada (CARPENTER, 2000).

A terapia anti-retroviral pode ser classificada como: monoterapia, utilização de um inibidor da transcriptase reversa; terapia combinada com dois inibidores da transcriptase reversa; e a combinação de dois inibidores da transcriptase reversa e um inibidor da protease, este último regime também é conhecido como terapia anti-retroviral de alta atividade. Ocorre uma substancial redução no aparecimento de infecções oportunistas bem como uma redução na mortalidade quando a terapia combinada é introduzida (HOGG, 1998; EGGER, 1997). Embora as doenças oportunistas relacionadas com a AIDS, continue a ocorrer, os fatores de risco para a progressão clínica durante a terapia até o momento não estão definidos. Os riscos de desenvolvimento de infecções oportunistas em pacientes recebendo terapia anti-retroviral é maior durante os primeiros meses de tratamento (LEDERGERBER, 1999), no entanto, este risco é consideravelmente menor quando comparado com pacientes que não são tratados.

A administração de múltiplos fármacos tem ajudado a solucionar o aparecimento de cepas resistentes. É mais difícil que o HIV desenvolva resistência à terapia combinada, e qualquer variante resistente a este regime terapêutico provavelmente será mais fraca que os vírus selvagens. Para reduzir a taxa de emergência de vírus mutante é razoável que se utilize combinações de fármacos que reduzam o RNA viral a níveis mais baixo, pelo maior período de tempo, com minimização da toxicidade. A carga viral deve ser determinada duas a quatro semanas após o início da terapia e se o efeito antiviral não foi significativo o protocolo deve ser modificado. Se a resposta for satisfatória e o paciente estiver assintomático, mesmo assim é necessário o acompanhamento dos níveis virais no plasma periodicamente (CARPENTER, 2000).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a eficácia da terapia anti-retroviral que combina dois fármacos análogos nucleotídeos e um fármaco não análogo nucleotídeo, inibidores da transcriptase reversa em um intervalo de tempo de 180 dias.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos dos fármacos análogos nucleotídeos sobre os linfócitos do sangue periférico por citometria de fluxo.
- Avaliar o efeito da terapia anti-retroviral sobre os marcadores séricos e hematológicos de anemia.
- Avaliar o grau de adesão dos pacientes ao regime terapêutico, utilizando como parâmetro a determinação do volume corpuscular médio dos eritrócitos.
- Aplicar a técnica de citometria de fluxo para evidenciar células vivas, células em apoptose e células mortas.

- Comparar os resultados de viabilidade celular com os marcadores de ativação imune.
- Comparar os resultados de viabilidade celular com os marcadores de recuperação da resposta imune.

### **3. PACIENTES E MÉTODOS**

#### **3.1 Aspectos éticos**

O presente projeto teve aprovação dos Comitês de ética da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, do Hospital Nereu Ramos e da Secretaria Municipal de Saúde da Cidade de Florianópolis, conforme preconizado pela convenção de Helsinque.

Para este estudo foram selecionados 10 voluntários, comprovadamente HIV soropositivos, confirmados por dois testes com princípios metodológicos diferentes, de acordo com o protocolo definido pelo Ministério da Saúde. Após terem sido devidamente esclarecidos sobre os objetivos da pesquisa, e de que somente os resultados seriam tornados públicos, todos os voluntários consentiram em participar da mesma e assim o declararam conforme anexo XXI. Nenhum dos voluntários, bem como os membros da equipe de pesquisa receberam qualquer tipo de remuneração por sua realização.

### 3.2 Pacientes

Os pacientes apresentaram em uma primeira avaliação a contagem de Linfócitos TCD4 abaixo de 500 cél./mm<sup>3</sup>, condição exigida para a participação no estudo.

Dos dez voluntários cinco eram do sexo feminino e cinco do sexo masculino, quatro declararam terem sido contaminados por via sexual e seis por compartilhamento de seringas e agulhas para o uso de drogas injetáveis.

No início do estudo, nenhum dos voluntários fazia uso de qualquer tipo de terapia ou apresentava infecções oportunistas que pudessem se sobrepor a infecção pelo HIV e interferir nas análises laboratoriais. Nenhum paciente havia recebido terapia anti-retroviral antes do estudo e o regime terapêutico instituído foi somente com inibidores da transcriptase reversa.

Depois de avaliados por médicos do Hospital Nereu Ramos e do Ambulatório de DST/AIDS do posto de Saúde II, da secretaria de Saúde do Município de Florianópolis, os voluntários foram encaminhados ao Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU/UFSC) para a realização da coleta de material biológico e posterior análise.

As amostras de sangue foram colhidas por venopunção antero-cubital, após jejum de 12 a 14 horas, utilizando-se do sistema de coleta a vácuo. Foram colhidos,

aproximadamente 10 ml de sangue em tubos contendo EDTA para a realização dos seguintes exames: contagem total e diferencial de leucócitos, contagem de eritrócitos, determinação de hematócrito e hemoglobina, contagem de plaquetas, contagem de linfócitos CD<sub>4</sub> e CD<sub>8</sub> e determinação da carga viral.

Outra amostra contendo 4 ml de sangue foi coletada em tubo sem anticoagulante para avaliação dos níveis de ferro sérico e ferritina, 4mL em tubo sem anticoagulante para dosagem de imunoglobulinas, TNF- $\alpha$ , e  $\beta$ -2-microglobulina e 10ml em tubo contendo Heparina Sódica para avaliação da viabilidade celular.

Todos os voluntários foram avaliados nos tempos 0 (zero), 1 (sessenta dias), 2 (cento e vinte dias) e 3 (cento e oitenta dias) após o início da terapia anti-retroviral.

### **3.3 Fracionamento do Sangue**

Para a obtenção do soro e do plasma, o sangue foi centrifugado a 2.500 rpm (1050g) em centrífuga Celm, modelo LS II por 10 minutos. Após a primeira separação e obtenção do soro e do plasma, estes foram novamente centrifugados para que fosse evitadas eventuais interferências de hemácias nas determinações a serem realizadas.

### 3.4 Hemograma

As determinações do número total de leucócitos, eritrócitos, plaquetas bem como os índices hematimétricos, hematócrito e hemoglobina foram realizadas em aparelho de automação Coulter Maxim Autoloader® no setor de Hematologia do Laboratório de Análises Clínicas do HU/UFSC. Além das análises automatizadas, todos os hemogramas e demais parâmetros foram determinados por técnicas realizadas de acordo com a disciplina de Hematologia do Departamento de Análises Clínicas da UFSC. Os valores de referência são:

- Leucócitos ..... 4.500 a 11.000/mm<sup>3</sup>;
- Eritrócitos ..... 4.300 a 6,0 milhões/mm<sup>3</sup>
- Plaquetas ..... 150.000 a 350.000/mm<sup>3</sup>
- Hematócrito ..... 37 a 50%
- Hemoglobina ..... 12 a 18 g/dL

### 3.5 Níveis Séricos de Ferritina

A determinação dos níveis séricos de ferritina, foram realizadas por método Imunométrico, utilizando-se aparelho IMMULITE Analyser® fornecido pela DPC –

---

Los Angeles – EUA, que utiliza marcadores quimiluminescentes específicos contra a Ferritina. As análises foram realizadas a partir dos espécimes sorológicos obtidos dos voluntários no Laboratório de Análises Clínicas do HU/UFSC. Os valores de referência utilizados para este analito foram os seguintes:

Mulheres: .....9 a 120 ng/ml

Homens: .....18 a 370 ng/ml.

### 3.6 Níveis de Ferro Sérico

A determinação dos níveis de Ferro sérico foi realizada com material propriamente descontaminado com solução de Ácido Clorídrico 50% v/v, e, enxaguado com água Millique® para que fossem evitadas interferências decorrentes de outros íons metálicos ou pelo próprio Ferro. Os espécimes sorológicos foram analisados no laboratório de Análises Clínicas HU/UFSC, sendo utilizada a metodologia de turbidimetria. O equipamento utilizado foi o turbidímetro BEHRING®, e os valores de referência seguidos para este analito foram:

Mulheres: .....35 a 150 µg/dL

Homens: .....35 a 150 µg/dL

### 3.7 Determinação dos Níveis das Imunoglobulinas A, G e M.

Os níveis séricos de IgA, IgG e IgM, foram determinados por nefelometria, que consiste na medida da concentração de complexos antígenos-anticorpos, utilizando-se antisoros específicos. A intensidade da luz medida é proporcional a quantidade de complexos antígenos-anticorpos presentes na amostra. As determinações foram analisadas em analisador modelo DADE Behring no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário, UFSC. Os valores de referência para este analito foram:

- IgA adultos ..... 70 a 400 mg/dL
- IgG adultos ..... 700 a 1600 mg/dL
- IgM adultos ..... 40 a 230 mg/dL

### 3.8 Dosagem de TNF- $\alpha$ e $\beta$ -2-Microglobulina

A determinação dos níveis séricos de TNF- $\alpha$  e  $\beta$ -2 microglobulina foram realizadas por método Imunométrico, utilizando-se aparelho IMMULITE Analyser® fornecido pela DPC – Los Angeles – EUA, que utiliza marcadores quimiluminescentes específicos para TNF- $\alpha$  e  $\beta$ -2 microglobulina. As análises foram realizadas a partir dos espécimes sorológicos obtidos dos voluntários no Laboratório

---

de Análises Clínicas do HU/UFSC. Os valores de referência utilizados para estes analitos foram:

TNF- $\alpha$ ..... < 8.1 pg/ml.

$\beta$ -2 M..... 1.010 – 1.730 pg/ml.

### 3.9 Viabilidade Celular

O estudo da viabilidade celular dos linfócitos foi realizado após cultura de células pelo período de 48 horas. Os linfócitos foram obtidos das amostras coletadas dos voluntários e processadas no mesmo dia para separação por gradiente de densidade em Ficoll Paque® d= 1.016.

Após a coleta em tubo com Heparina Sódica o sangue foi centrifugado por 10 minutos a 2.000 rpm (1.000 g), a temperatura ambiente e a película de células brancas formada foi aspirada com Pipeta Pasteur e transferida para um tubo contendo 5ml de solução tampão de fosfato (PBS) pH 7,4. Esta suspensão foi então homogeneizada suavemente, e, transferida para outro tubo contendo 2 ml de Ficoll Paque® (Pharmacia) com densidade de 1.016 específica para linfócitos, formando assim uma solução bifásica que foi levada a centrifugação por 20 minutos a uma velocidade de 2.000 rpm (1.000 g). O “anel” de linfócitos formado foi retirado por aspiração com pipeta Pasteur, as células foram lavadas duas vezes em 5 mL de solução PBS pH 7,4. Após o processo de lavagem o botão de células foi ressuspenso em 1 ml de meio RPMI-1640, e uma pequena alíquota foi utilizada para

---

contagem em Câmara de Neubauer. Após a quantificação, a suspensão celular foi ajustada de forma que fosse obtida a concentração final de  $1 \times 10^6$  células/mL de suspensão.

As células foram cultivadas em placas de 24 poços em meio RPMI suplementado com soro bovino fetal, solução estreptomicina 10 mg/ml mais penicilina 10.000UI (Sigma) e anfotericina 50mg (Eurofarma) por 48 horas em estufa com atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5% à 37°C. Transcorrido o tempo de cultura as células foram cuidadosamente homogeneizadas, retiradas da placa, ressuspensas e centrifugadas por 5 minutos a 1500 *rpm*, sendo o seu sobrenadante desprezado. As células foram coradas em 200 µL de solução de uso (Brometo de Etídio e Calceína) para ensaio de apoptose onde permaneceram por 15 minutos em repouso, na ausência de luz e à temperatura ambiente.

A avaliação da viabilidade celular foi realizada em Citômetro de Fluxo Becton Dickison FACSCALIBUR® do Laboratório Médico Santa Luzia de Florianópolis, onde foram classificadas como viáveis, apópticas e mortas de acordo com o tamanho, granulosidade e da fluorescência emitida. Os resultados obtidos foram expressos em porcentagem de células por eventos adquiridos.

A citometria de fluxo é uma adaptação da técnica de imunofluorescência utilizada para estudos de imunofenotipagem e viabilidade celular. Para avaliação da viabilidade celular os marcadores fluorescentes utilizados foram o Brometo de Etídio (BE) e a Calceína (CA). O BE penetra em células mortas e quando liga-se ao DNA hipodiplóide emite uma fluorescência vermelha a 488nm. A CA em baixas

---

concentrações intercala-se na dupla hélice de DNA diplóide e emite fluorescência verde, caracterizando as células vivas. Uma terceira população de células apresentado tamanho e coloração intermediária pode ser observada no histograma e classificada como células em apoptose (anexo XXII). Além dos parâmetros de fluorescência, os linfócitos foram selecionados de acordo com os padrões de tamanho e granulosidade. Para cada amostra um mínimo de 10.000 eventos foram adquiridos pelo citômetro de fluxo.

Solução de uso para ensaio de apoptose

Calceína AM	1 $\mu$ L
Solução de Etídio	2mL

### 3.10 Contagem diferencial de Linfócitos CD4 e CD8

A contagem diferencial de linfócitos CD4 e CD8 foi efetuada em amostras de sangue total, colhidas por sistema a vácuo, em tubos contendo EDTA. A amostra foi fracionada, e uma fração de 50 $\mu$ L foi tratada com solução lisante para que fosse eliminada uma possível interferência causada pelas hemácias. Após a lise das hemácias, as células foram marcadas com anticorpos monoclonais Becton Dickinson®, e, após esta marcação foi realizada a identificação e contagem das populações de linfócitos presentes na amostra. A leitura foi realizada em Citômetro de Fluxo Becton Dickinson FACSCALIBUR® do Laboratório Médico Santa Luzia de Florianópolis. Os valores de referência assumidos para a contagem diferencial de

---

linfócitos CD4 e CD8 foram os seguintes: CD4 500 à 1500/mm<sup>3</sup>, CD8: 300 à 1000/mm<sup>3</sup>.

### 3.11 Determinação da Carga Viral

As determinações foram realizadas utilizando-se sangue total, que foi centrifugado a 1500 rpm, por 10 minutos para que fosse possível a separação do plasma. O plasma obtido da separação foi então armazenado em solução tampão lisante (Tiocianato de guanidina) para posterior determinação. A amostra é viável por 24 horas se armazenada a 20°C, por sete dias se armazenada a - 8°C e, por tempo indeterminado se armazenada a - 70°C. A metodologia utilizada para a quantificação da carga viral foi a de NUCLISENS, que consiste na amplificação das seqüências de bases dos ácidos nucléicos, baseada na tecnologia NASBA, para a determinação quantitativa do RNA do HIV em plasma humano.

O método aplicado consiste em três fases distintas:

- **Isolamento:** Onde é realizada a purificação do RNA conforme segue: Ao tampão de lise, onde estão contidos os ácidos nucléicos anteriormente liberados, são adicionados três RNAs sintéticos de concentração conhecida (Qa, Qb, Qc), respectivamente, alta, média e baixa. Estes RNAs servem como calibradores internos e cada um deles difere do HIV do tipo selvagem em apenas uma pequena seqüência. Em meio salino de elevada concentração todos os ácidos nucléicos

---

presentes no tampão, incluindo os calibradores, ligam-se às partículas de dióxido de silício que funcionam como base sólida. É então realizada uma série de lavagens para que os ácidos nucleicos sejam eluídos da fase sólida

- **Amplificação:** Qualquer RNA do HIV-1 do tipo selvagem eluído é co-amplificado com os três calibradores internos. A amplificação baseia-se na transcrição repetida, ou seja, são sintetizadas múltiplas cópias de cada seqüência selvagem e das seqüências alvo do calibrador de RNA, pela polimerase de RNA através de uma molécula de DNA intermediária que contém o promotor de cadeia dupla para a polimerase de RNA. Cada cópia de RNA transcrita entra em um novo ciclo de amplificação. A seqüência amplificada corresponde a região *gag* do HIV-1.

- **Hibridização:** É a fase onde é realizada a “revelação” e detecção através de eletroquimioluminescência, do número de partículas amplificadas marcadas com Rutênio. Para diferenciar os amplificados (Selvagem, Qa, Qb, Qc), são adicionadas alíquotas da amostra amplificada, a quatro soluções de hibridação, cada uma específica para um dos amplificados. Os respectivos amplificados são hibridados com uma “esfera” revestida com estreptavidina e com uma sonda marcada com Rutênio. Estas esferas, transportam os complexos “amplificado-hibridizado-sonda” e são capturadas à superfície de um eletrodo por meio de um campo magnético. A voltagem aplicada ao eletrodo desencadeia a reação de eletroquimioluminescência. A luz emitida pelas sondas marcadas com rutênio é proporcional a quantidade de amplificado. Os cálculos baseados nas quantidades relativas dos quatro amplificados revelam a quantidade de RNA de HIV-1 selvagem originalmente

presente na amostra. As determinações foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas do HU/UFSC utilizando-se *kits* e equipamentos Organon – Tecknica®.

Os resultados são expressos da seguinte forma: nº de cópias/ml. Sendo também colocado o número de cópias expresso em *log* para possibilitar o estudo do desenvolvimento de resistência à terapia anti-retroviral.

### **3.12 Análise Estatística**

Todas as medidas das variáveis estudadas foram comparadas intragrupo. Para as análises intragrupo foi utilizada análise de variância para medidas repetidas com intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Efeito da terapia anti-retroviral sobre a contagem de linfócitos TCD4.

A tabela 1 apresenta os dados da contagem de células TCD4. Conforme estes dados observa-se que houve aumento estatisticamente significativo no número de células CD4 no tempo 180 dias ( $456 \text{ cél./mm}^3$ ) em relação ao tempo "0" dias ( $316 \text{ cél./mm}^3$ ) ( $p < 0.05$ ). Quando analisamos individualmente os pacientes (anexo I), podemos observar que somente um paciente (149), não apresentou o mesmo comportamento, com a contagem de LTCD4 tendendo a ligeira redução. Contudo o número de células TCD4 deste paciente já se apresentava reduzido antes do início da TARV ( $85 \text{ cél. /mm}^3$ ).

**Tabela 01 - Determinação diferencial de Linfócitos TCD<sub>4</sub> em U/mm<sup>3</sup>, nos tempos estudados.**

Variáveis	Linfócitos CD4 U/Mm <sup>3</sup>			
	Tempo (dias)			
	0	60	120	180
Média	316	402,3	429,1	454,8*
SD	171,08	264,91	231,41	270,18
Máximo	639	793	808	885
Mínimo	85	67	64	67

\*  $p < 0.05$  no tempo 180 dias em relação ao tempo "0".

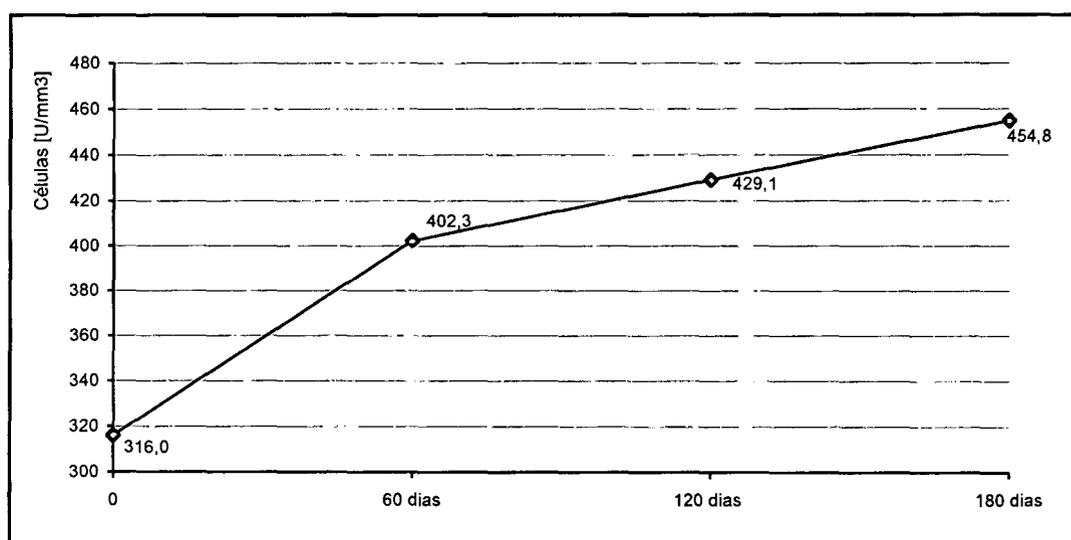


Figura 06 - Determinação diferencial de Linfócitos TCD<sub>4</sub> em U/mm<sup>3</sup>, nos tempos estudados.

Um importante marcador da infecção pelo HIV é a depleção dos linfócitos TCD4. Vários mecanismos têm sido postulados para explicar como o vírus provoca este fenômeno, incluindo a diminuição na geração de células T na medula óssea, capacidade de renovação limitada, aumento na destruição de células infectadas e não infectadas pelo HIV e aumento na morte programada (apoptose) (AMEISSEN, 1992; FAUCI, 1996). Por estas razões a contagem de CD4 é um importante marcador para monitorar pacientes assintomáticos, instituir terapia profilática e iniciar e avaliar a eficácia da terapia anti-retroviral (O'BRIEN, 1996).

Em nosso estudo foi observado que a utilização da TARV aumentou significativamente o número de células CD4 em 90% dos pacientes estudados. Em estudos realizados por Ho *et al* (1995) e Wei *et al* (1995) o aumento na contagem de CD4 foi observado na maioria dos pacientes já nos primeiros 30 dias após o início da TARV. Outro fato importante que pode ser observado nos resultados obtidos tanto

---

dos pacientes que responderam a TARV quanto ao paciente que não respondeu a TARV é que a contagem de CD4 é inversamente proporcional a carga viral (tabela 03), o que significa dizer que a replicação do HIV tem um forte impacto sobre o *turnover* das células CD4.

O aumento no número de CD4 após o início da TARV obtido em nosso estudo, segundo alguns autores pode ser atribuído a: inicialmente a repopulação de células TCD4 liberadas dos linfonodos para o sangue periférico, seguido da geração de novas células pela medula óssea (HO, 1995; WEI, 1995; BUCY, 1999), aumento na proliferação das células de memória (AUTRAN, 1997; FLEURY, 2000), redução da apoptose (JOHNSON, 1998; NOKTA, 1999), redução da infecção pelo HIV das células TCD4 recém liberadas para o sangue periférico, devido a interferência dos fármacos anti-retrovirais com a maturação do HIV (WOLTHERS, 1998) e a redução da ativação do sistema imune que é o principal mecanismo de ativação da apoptose em células CD4 e CD8 (AUTRAM, 1997).

#### **4.2 Efeito da TARV sobre a contagem de células CD8**

Na tabela 2 estão demonstrados os dados da contagem de células CD8. Não foi observada variação estatisticamente significativa ( $p > 0.05$ ) nos tempos estudados. Porém há uma redução modesta, mas progressiva na contagem de CD8 ao longo do estudo em 70% dos pacientes avaliados, com os resultados mantendo-se dentro dos valores de referência preconizados (300-1000 cél. /mm<sup>3</sup>). Somente

um paciente (144 anexo II) apresentou o valor de CD8 inferior ao valor mínimo de referência (187 cél./mm<sup>3</sup>) no final do estudo que pode ser compatível com o valor basal (380 cél./mm<sup>3</sup>).

**Tabela 02 - Determinação diferencial de Linfócitos CD8 em U/mm<sup>3</sup>, nos tempos estudados.**

Linfócitos CD8 U/mm <sup>3</sup>				
Variáveis	Tempo (dias)			
	0	60	120	180
Média <sup>1</sup>	973,9	858,1	873,4	795,6*
SD	270,18	550,61	475,6	350,72
Máximo	885	1987	1614	1316
Mínimo	67	380	340	300

<sup>1</sup>  $p > 0,05$  no tempo 180 dias em relação ao tempo "0".

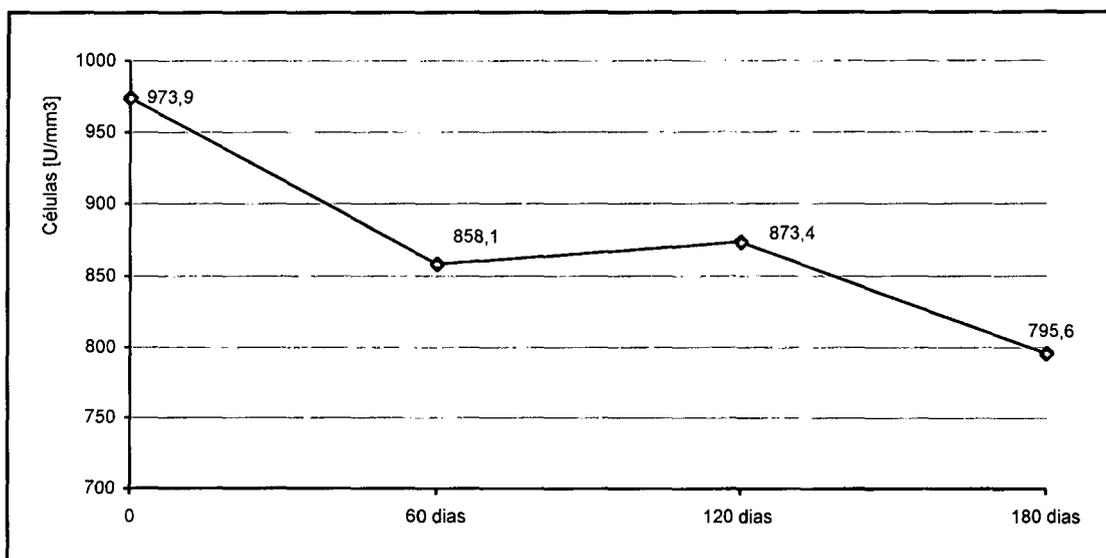


Figura 07 - Determinação diferencial de Linfócitos CD<sub>8</sub> em U/mm<sup>3</sup>, nos tempos estudados.

Em resposta ao ataque ao organismo por vírus, o sistema imune utiliza dois mecanismos de proteção, humoral (anticorpos) e celular (linfócitos). Quando uma infecção viral transpõe as barreiras imunes, o resultado é uma doença aguda, que pode desaparecer rapidamente, levar o indivíduo a óbito ou tornar-se crônica. Nesta batalha do sistema imune contra o HIV, o vírus ainda é o vencedor. A principal resposta imune contra o HIV que culmina na redução da carga viral, envolve os linfócitos TCD8 (OLDSTONE, 1997). Os linfócitos TCD8 possuem papel central no controle da infecção e alterações funcionais nestas células, observadas normalmente em estágios mais avançados da infecção pelo HIV, resultando em aumento da carga viral (BORROW, 1994).

Os linfócitos TCD8 reconhecem o peptídeo viral ligado à molécula MHC de classe I que é expresso na membrana das células infectadas. Um único complexo peptídeo antigênico-MHC-I é capaz de ativar os LTCD8, que além de lisar a célula

---

infectada pelo vírus, inibe a atividade viral por mecanismos não líticos, que envolve a liberação de interferon- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e outros fatores solúveis (WALKER, 1986).

Segundo Nowak *et al.* (1999) a potente resposta exercida pelo LTCD8 contra o HIV parece ser o mecanismo responsável pelo surgimento de cepas mutantes com seleção de variantes capazes de “escapar” à resposta imune e isto é incompatível com a forte resposta dos LTCD8 na infecção primária.

As alterações funcionais observadas nos LTCD8, de pacientes HIV, são em decorrência das alterações quantitativas e qualitativas dos LTCD4, já que estas células possuem papel central na regulação da resposta imune, através da síntese e secreção de citocinas (POWDERLEY, 1998).

Em consenso com estas afirmações podemos concluir que a manutenção das funções e do número dos LTCD8, no curso da infecção pelo HIV, é fundamental na preservação do estado clínico e imunológico do paciente.

Conforme o nosso estudo demonstrou, a TARV foi eficaz na manutenção do número de LTCD8 dentro dos valores de referência. Embora uma ligeira redução tenha sido observada, ela pode ser atribuída, segundo Gray *et al* (1998) a redução de clones de LTCD8 HIV específicos, uma vez que após a redução da carga viral com a TARV, um menor número destas células é requerido para a atividade antiviral do sistema imune.

A dinâmica de redução dos LTCD8 é um fator de risco para doenças oportunistas e reativação da replicação viral e pode indicar que o paciente não apresenta pleno restabelecimento das defesas imunes.

---

A eficácia do regime terapêutico instituído aos nossos pacientes pode ser comprovada com a redução não significativa dos LTCD8, resultado da marcante supressão dos níveis de HIV plasmático. Com exceção do paciente 144 (anexo II), cujo número de linfócitos TCD8 apresentou-se reduzido ao longo do estudo e não apresentou relação com a carga viral (anexo III). Estes resultados não invalidam o sucesso do regime terapêutico, mas nos permitem sugerir que este paciente apresentou uma disfunção imune que não foi revertida com o uso da TARV. A recuperação completa do sistema imune após o uso da TARV pode não ser alcançada em todos os pacientes tratados, levando a crer que fatores específicos do vírus e do hospedeiro podem ser determinantes na recuperação do sistema imune. O curso da infecção pelo HIV no início da TARV também pode ser crítico para redução da deterioração do sistema imune (POWDERLY, 1998).

Com relação aos resultados desconectos entre CD4, CD8 e CV observados em nosso estudo e a ausência de sintomatologia nos pacientes que apresentaram este comportamento, é razoável assumir que dos muitos sistemas biológicos, o sistema imune é provavelmente o mais redundante. Então perturbações exacerbadas podem ser necessárias para estabelecer uma condição de risco para o indivíduo.

É importante ressaltar que uma relação entre os resultados de carga viral, LTCD4 e LTCD8 foi observada na maioria dos pacientes avaliados e estes parâmetros podem ser seguramente utilizados para monitoramento da eficácia da TARV e servem como marcador prognóstico da evolução da infecção pelo HIV.

### 4.3 Efeito da Terapia Anti-retroviral sobre a Carga Viral

Os dados obtidos com relação aos estudos com a carga viral estão apresentados na tabela 3.

De acordo com estes dados, ocorreu uma redução significativa na carga viral 60, 120 e 180 dias após o início da TARV, em relação ao tempo zero (antes do tratamento). O valor médio foi reduzido de 150.000 cópias/ml para 3.198 cópias/ml. Porém dois pacientes apresentaram um aumento na carga viral no tempo 180 dias (anexo III).

**Tabela 3 - Determinação da Carga Viral, em número de cópias/ml, nos tempos estudados.**

Variáveis	Carga Viral (nº de cópias/ml)			
	Tempo (dias)			
	0	60	120	180
Média	150.200	6.276*	2.889*	3.198*
SD	204.681	8.428,6	7.429,9	5.453,8
Máximo	720.000	28.000	24.000	18.000
Mínimo	48.000	80	80	80

\*  $p < 0.05$  nos tempos 60, 120 e 180 dias em relação ao tempo "0".

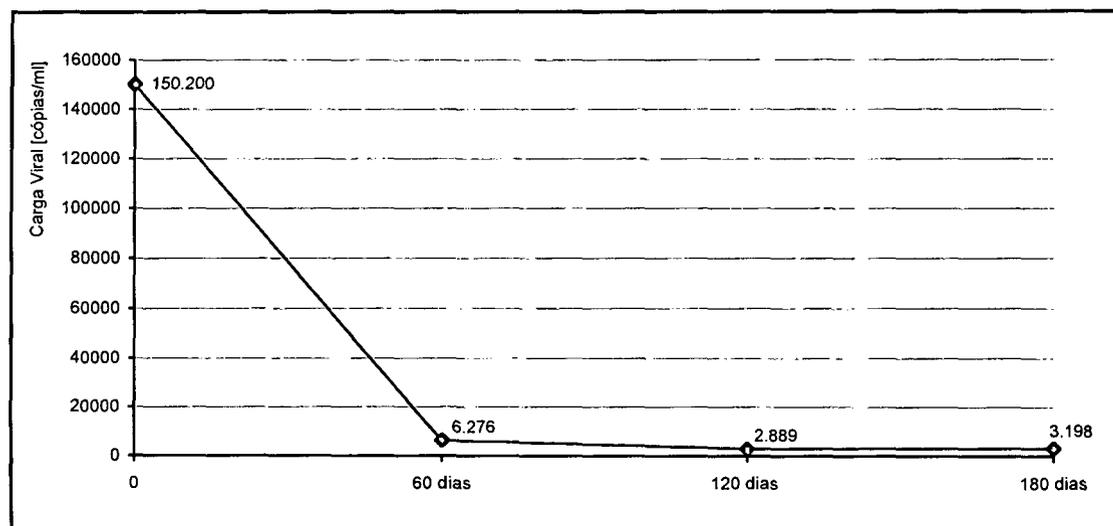


Figura 08 - Determinação da Carga Viral, em número de cópias/ml, nos tempos estudados.

O início da terapia anti-retroviral normalmente está associada com rápido declínio da carga viral. Porém alguns estudos demonstraram que a TARV não é capaz de bloquear completamente a replicação do HIV, sugerindo que o vírus pode perpetuar continuamente com poucos ou nenhum dano para o sistema imune (FURTADO, 1999; NATARAJAN, 1999). Segundo estudo de Finzi, *et al.* (1997) o HIV permanece nos linfócitos do sangue periférico e dos tecidos linfóides, na sua forma latente ou com replicação controlada, sem efeitos citopáticos para a célula hospedeira. Estas células representam um importante reservatório viral em pacientes recebendo TARV.

A redução da carga viral a níveis indetectáveis é observada com maior frequência em pacientes que receberam terapia anti-retroviral altamente eficiente, que consiste em dois inibidores da transcriptase reversa e um inibidor da protease (GULIK, 1998; ERB, 2000). O regime terapêutico recebido por nossos pacientes,

---

também mostrou ser efetivo para maioria dos pacientes e apresentou resultados semelhantes aos alcançados com regime triplo (< 80 cópias/ml).

Como os pacientes apresentavam-se assintomáticos no decorrer do estudo, a persistência de valores aumentados em dois pacientes pode ser explicado pelo desenvolvimento de doenças intercorrentes como amigdalite, faringite, resfriado ou outras infecções causadas por bactérias e vírus, que não caracterizavam uma infecção oportunista comum na infecção pelo HIV. Este aumento (reativação) da carga viral com o regime anti-retroviral pode ocorrer também quando o paciente é imunizado, o que não se aplica aos nossos pacientes, uma vez que todos receberam apenas a medicação anti-retroviral, sem nenhum tratamento profilático. Em apenas um dos pacientes estudados não foi observado uma supressão satisfatória da carga viral, fato este que pode ter ocorrido por falta de adesão adequada ao tratamento, absorção inadequada dos fármacos ou resistência do HIV à terapia instituída (STEINBROOK, 2000).

A determinação da carga viral no plasma é um importante marcador prognóstico de progressão para AIDS (MELLORS, 1997) e de monitoramento da TARV (MARSCHNER, 1998).

#### 4.4 Efeito da TARV sobre a Viabilidade das Células Mononucleares do Sangue Periférico

As tabelas 4, 5 e 6 apresentam as porcentagens de células viáveis, células apoptóticas e células inviáveis, respectivamente, nos tempos estudados. Segundo estes dados podemos observar alterações estatisticamente significativas ( $p < 0.05$ ) para as três avaliações. Ocorreu aumento da porcentagem de células viáveis (44,90%) do tempo 180 dias em relação ao tempo "0" (22,3%), redução da porcentagem de células apoptóticas (48,59%) no tempo 180 dias em relação ao tempo "0" (66,41%) e redução da porcentagem de células inviáveis (6,62%) no tempo 180 dias em relação ao tempo "0" (11,36%).

**Tabela 04 - Número de células viáveis, em porcentagem, nos tempos estudados.**

Variáveis	Células viáveis (%)			
	Tempo (dias)			
	0	60	120	180
Média	22,23	31,16	37,60	44,90*
SD	17,86	16,02	21,728	18,571
Máximo	52,54	49,85	72,66	73,22
Mínimo	2,51	7,33	2,85	15,16

\*  $p < 0.05$  no tempo 180 dias em relação ao tempo "0".

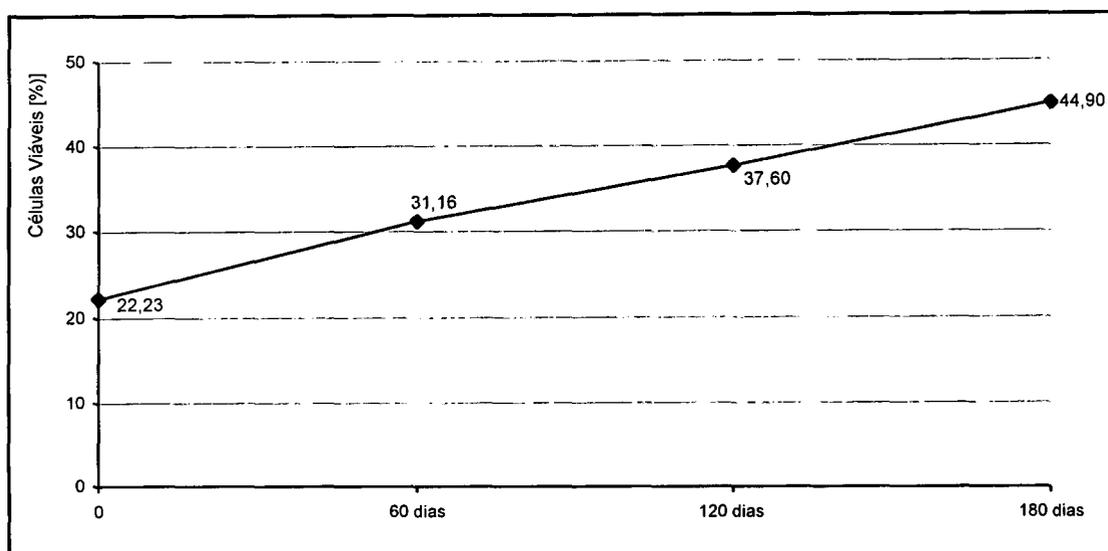


Figura 9 - Número de células viáveis, em porcentagem, nos tempos estudados.

Tabela 05 - Número de células apópticas, em porcentagem nos tempos estudados.

Variáveis	Células apópticas (%)			
	Tempo (dias)			
	0	60	120	180
Média	66,41	61,38	44,193	48,597*
SD	15,482	17,894	15,877	18,792
Máximo	85,58	87,05	73,57	82,95
Mínimo	38,93	44,58	21,35	22,03

\*  $p < 0.05$  no tempo 180 dias em relação ao tempo "0".

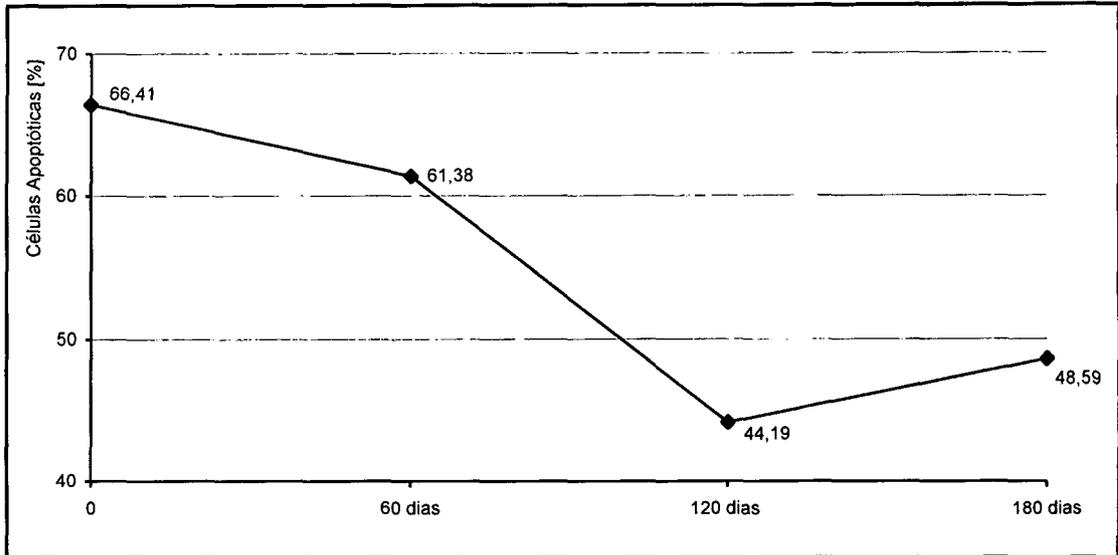


Figura 10 - Número de células apoptóticas, em porcentagem nos tempos estudados.

**Tabela 06 - Número de células inviáveis, em porcentagem, nos tempos estudados.**

Variáveis	Células inviáveis (%)			
	Tempo (dias)			
	0	60	120	180
Média	11,359	7,42	18	6,621*
SD	6,776	5,464	15,524	4,797
Máximo	24,25	16,76	50,84	14,210
Mínimo	1,36	1,27	1,32	1,99

\*  $p < 0.05$  no tempo 180 dias em relação ao tempo "0".

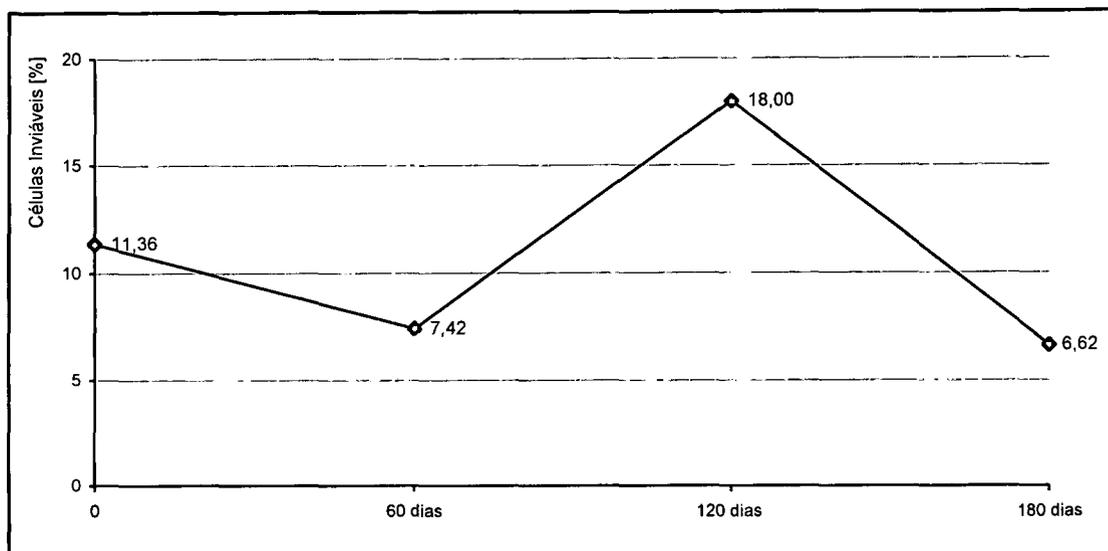


Figura 11 - Número de células inviáveis, em porcentagem, nos tempos estudados.

A demonstração de aumento da susceptibilidade para apoptose dos linfócitos de pacientes HIV positivos (AMEISSEN, 1991; GOUGEON, 1996), torna evidente sua participação no processo de depleção das células CD4, com conseqüente disfunção imune (AMEISSEN, 1991; GOUGEON, 1996; SAMUELSSON, 1997). As Alterações na resposta imune celular, como síntese e liberação de interleucinas (WESTBY, 1998), proteínas solúveis do HIV como a gp 120, que inicia o processo de morte de LTCD4 (BANDA, 1992) e proteínas regulatórias do HIV, como a proteína tat, que é capaz de inibir a proteína anti-apoptótica bcl-2 (SASTRY, 1996), parecem exercer um papel importante na indução da apoptose destas células. Segundo Gougeon *et al* (1993). Todas as populações de linfócitos estão envolvidas neste processo, tanto de indivíduos clinicamente hígidos quanto de indivíduos HIV positivos. Porém a morte de linfócitos por apoptose em indivíduos HIV positivos é significativamente aumentada, quando comparada com indivíduos sadios.

---

A TARV apresenta efeito protetor sobre os linfócitos, o que garante o aumento do número de células viáveis com o tratamento. Segundo Andersson *et al.* (1998) a TARV pode reduzir em até 40% a expressão dos co-receptores, CCR5 e CXCR4, reduzindo assim a capacidade do HIV livre no plasma infectar outras células. Como já foi citado anteriormente, além dos receptores CD4 o HIV necessita dos co-receptores CCR5 e CXCR4 para penetrar na célula hospedeira. A outra maneira, segundo Li *et al.* (1995) e Sastry *et al.* (1996) a máxima supressão da carga viral, alcançada com a TARV, resulta na diminuição de produtos solúveis do HIV. A TARV pode também influenciar indiretamente na diminuição da apoptose dos linfócitos, com a normalização da produção de citocinas (JOHNSON, 1998). Ainda segundo Nokta *et al.* (1999) e Johnson *et al.* (1998), um regime anti-retroviral adequado é capaz de reduzir a apoptose dos linfócitos do sangue periférico, o que pode contribuir para o aumento na contagem de CD4 em pacientes tratados (CAGGIARI, 2000). Porém, em nossos estudos, o aumento observado na população de células CD4 não foi proporcional a redução da porcentagem de células em apoptose, e a justificativa para esse achado é a de que, para o nosso experimento foi feita avaliação da apoptose dos linfócitos totais e como logo após a resolução de uma resposta imune ocorre apoptose fisiológica dos linfócitos CD8, a manutenção de valores relativamente aumentados de células apoptóticas na realidade pode ser reflexo da apoptose das células CD8. Estudo das populações de células CD4 e CD8 separadamente poderiam esclarecer melhor nossos resultados.

Os resultados obtidos em nosso estudo sugerem que, apesar da redução significativa da porcentagem de células apoptóticas após o tratamento, os valores

---

não são similares aos obtidos de indivíduos clinicamente saudáveis (3%-20%). Por esta razão sugerimos que: a despeito da redução da carga viral, em função da TARV, que em alguns de nossos pacientes alcançou valores indetectáveis, o HIV não é totalmente eliminado e persiste produzindo antígenos, e, este é provavelmente o mecanismo primário da ativação crônica do sistema imune, que por sua vez é o mecanismo responsável pela indução da apoptose em linfócitos de indivíduos HIV positivos o que poderia contribuir para o colapso do sistema imune.

Em nosso experimento ao contrário do que reportou Samuelsson *et al.* (1997) não verificamos uma relação entre os valores da carga viral e o de células apoptóticas, sugerindo que a apoptose pode ser influenciada por outros fatores além da carga viral. Em estudo realizado por Johnson *et al.* (1998) a redução da apoptose foi observada em pacientes sem nenhuma redução da carga viral.

#### **4.5 Efeito da Terapia Anti-retroviral sobre a contagem de Leucócitos totais e Linfócitos totais**

Os valores estatísticos de leucócitos totais nos tempos estudados estão representados na tabela 07.

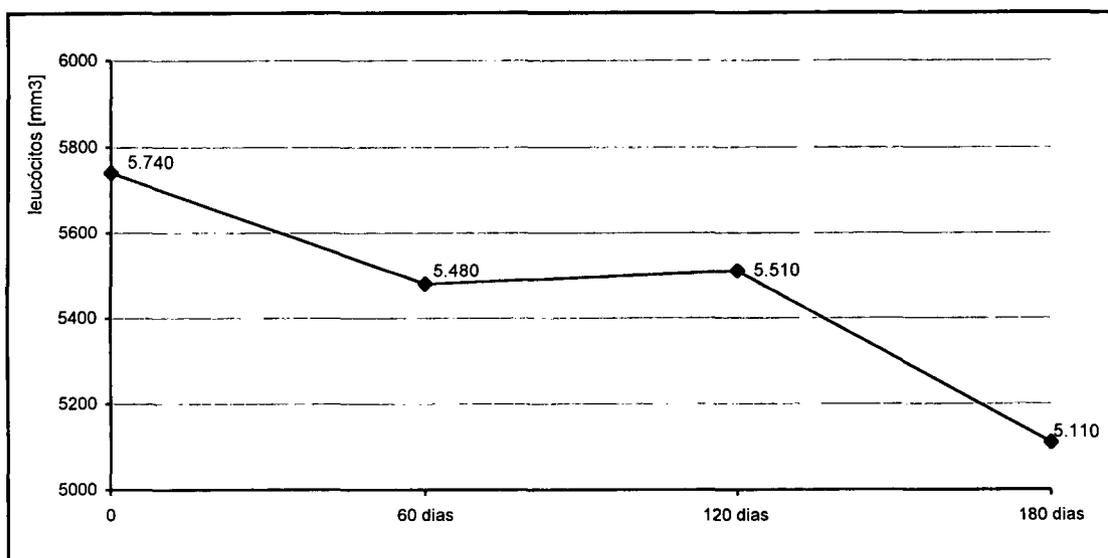
A análise estatística revela que não houve variação significativa ( $p > 0.05$ ) no tempo 180 dias em relação ao tempo "0". Porém no tempo 180 dias 80% dos

pacientes apresentaram o número de leucócitos totais diminuído, quando comparado com os valores de pré-tratamento (anexo VIII).

**Tabela 07 - Enumeração de Leucócitos totais, em células por milímetros cúbicos, nos tempos estudados.**

Variáveis	Leucócitos totais (/ mm <sup>3</sup> )			
	Tempo (dias)			
	0	60	120	180
Média <sup>1</sup>	5740	5480	5510	5110
SD	2851,2	2277,8	1724,6	1767,9
Máximo	14300	10100	9000	8500
Mínimo	4500	3100	3700	3800

<sup>1</sup>  $p > 0,05$  no tempo 180 dias em relação ao tempo "0".



*Figura 12 - Enumeração de Leucócitos totais, em células por milímetros cúbicos, nos tempos estudados.*

A tabela 08 apresenta o número de linfócitos nos tempos estudados. Os dados demonstraram que não houve alteração estatisticamente significativa ( $p > 0.05$ ) do tempo 180 dias em relação ao tempo "0", nesta população de células. Dos 10 pacientes avaliados, 5 apresentaram linfocitose, 1 apresentou linfopenia (anexo VII) e os demais pacientes apresentaram número de linfócitos dentro dos valores de referência (20% - 37%) no final do estudo. Como podemos observar a variação média, aumentou de 30.12% para 35.03% nos pacientes após 180 dias de tratamento, quando comparado com os valores basais.

**Tabela 08 - Enumeração dos Linfócitos totais, em porcentagem, nos tempos estudados.**

Variáveis	Linfócitos totais (%)			
	Tempo (dias)			
	0	60	120	180
Média <sup>1</sup>	30,12	33,67	31,32	35,03
SD	11,502	10,651	11,625	11,424
Máximo	51,0	45,7	48,1	50,4
Mínimo	12,4	13,2	14,8	13,5

<sup>1</sup>  $p > 0,05$  no tempo 180 dias em relação ao tempo "0".

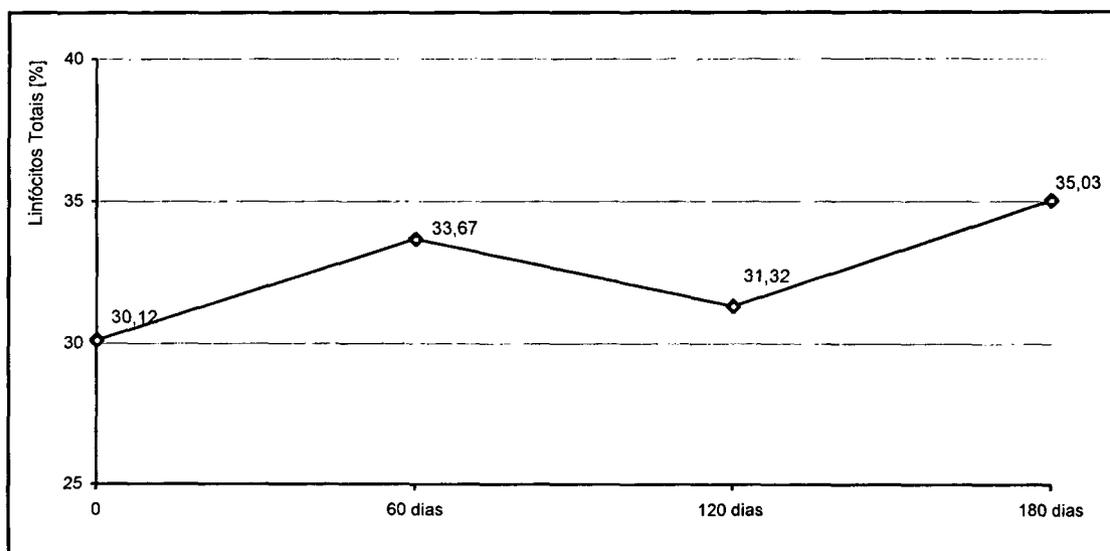


Figura 13 - Enumeração dos Linfócitos Totais, em porcentagem, nos tempos estudados.

Em relação ao número de leucócitos totais, a sua redução pode ser resultado da ação da TARV, sobre a linhagem de células brancas, especificamente sobre a população de leucócitos granulócitos e a leucopenia é um achado relativamente comum em doenças infecciosas de progressão lenta, como é o caso da infecção pelo HIV. Outro fator a se considerar é que como se trata de uma infecção viral, existe obviamente participação dos linfócitos e está bem referenciado pela literatura que no processo de formação de células brancas pela medula óssea, haja uma redução na produção da linhagem granulocítica para compensar a produção de linfócitos.

A discreta linfocitose observada na maioria dos pacientes em nosso estudo, pode estar relacionada com o aumento na contagem de LTCD4, após o tratamento e pode ser considerada um bom prognóstico, já que a evolução da infecção pelo HIV é caracterizada por linfopenia. Outra explicação para o aumento no número de

linfócitos é que estas células são as principais células que participam da resposta imune contra o ataque por vírus.

#### 4.6 Efeito da Terapia Anti-retroviral sobre os Marcadores Séricos de Anemia

Na tabela 9 estão demonstrados os valores de ferro sérico. Não foi observado nenhuma variação significativa ( $p > 0.05$ ) nos tempos estudados. Durante o estudo 90% dos pacientes apresentaram os valores de ferro dentro dos valores de referência (35-150  $\mu\text{g/dL}$ ) e somente 1 paciente (145 anexo IX) apresentou uma concentração sérica de ferro acima dos valores de referência (198  $\mu\text{g/dL}$ ).

**Tabela 09 - Determinação de Ferro Sérico, em  $\mu\text{g/dL}$ , nos tempos estudados.**

Variáveis	Ferro ( $\mu\text{g/dL}$ )			
	Tempo (dias)			
	0	60	120	180
Média <sup>1</sup>	88,7	97,3	82,3	98,3
SD	31,802	26,554	31,577	45,270
Máximo	140	156	164	198
Mínimo	47	65	60	60

<sup>1</sup>  $p > 0,05$  no tempo 180 dias em relação ao tempo "0".

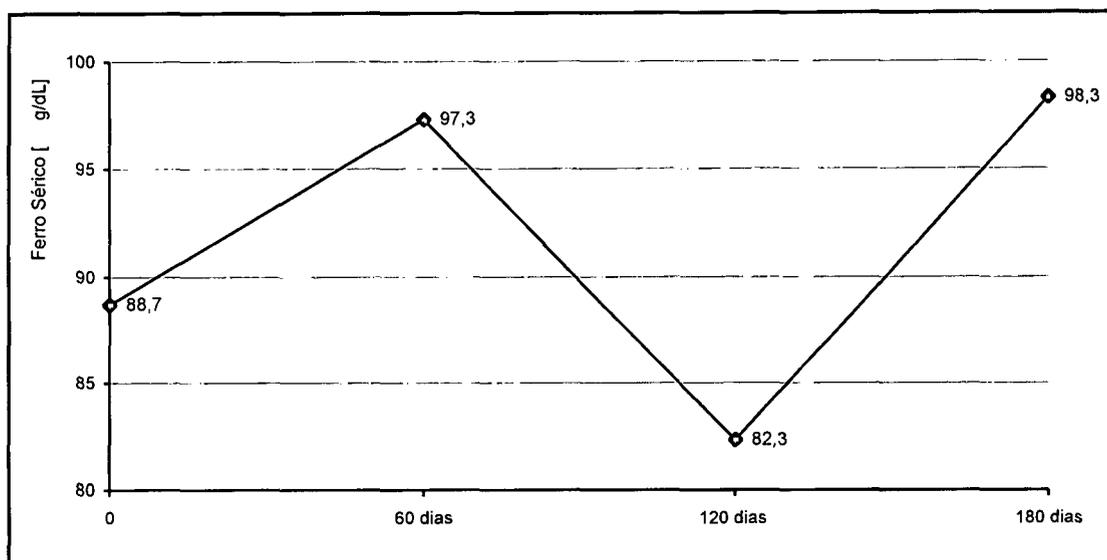


Figura 14 - Determinação de Ferro Sérico, em  $\mu\text{g/dL}$ , nos tempos estudados.

Vários autores já reportaram o papel do ferro na resposta imune. A homeostasia celular do ferro é importante para a função imune e ambas, deficiência e sobrecarga de ferro promovem alterações no sistema imune alterando a proliferação de linfócitos T e linfócitos B (BROCK, 1994). Além disso, o ferro participa da resposta citotóxica mediada por macrófagos, catalisando espécies reativas de oxigênio dentro dos fagolisossomas destas células (HALLIWEL, 1992). O aumento na concentração de ferro nas células do sistema monocítico fagocitário resulta em colapso na liberação de citocinas, como o  $\text{INF-}\gamma$  por exemplo, (WEISS, 1992).

Em nosso estudo foi dosado o ferro sérico, o qual não apresentou alterações significativas em todos os pacientes no período avaliado. Na infecção pelo HIV a relevância dos valores de ferro sérico deve ser focada para o seu aumento nos tecidos, que resulta muitas vezes em efeitos que comprometem a atividade celular,

especialmente do sistema imune (GORDEUK, 2001). Alguns autores sugerem inclusive a participação da ZDV, no aumento de ferro nos tecidos, e este, parece ser o mecanismo pelo qual a ZDV induz a anemia em pacientes HIV positivos (GOLDIN, 1993). Por outro, lado em recente estudo realizado *in vitro* por D'Alessandro *et al.* (2000) a ZDV parece não estar diretamente envolvida na sobrecarga de ferro nos tecidos, observada em pacientes que fazem uso deste fármaco, e sim causado por um mecanismo ainda desconhecido.

A tabela 10 mostra os valores de ferritina nos tempos estudados. Conforme os resultados obtidos podemos observar que houve uma redução estatisticamente significativa ( $p < 0.05$ ) do tempo 180 dias em relação ao tempo "0" e somente 2 pacientes (140 e 151 anexo X) os resultados se mantiveram elevados durante todo o estudo. Enquanto que nos demais pacientes os níveis de ferritina permaneceram dentro dos valores de referência neste mesmo período.

**Tabela 10 - Concentração da Ferritina Sérica, ng/dL, nos tempos estudados.**

Variáveis	Ferritina (ng/dL)			
	Tempo (dias)			
	0	60	120	180
Média	136,94	156,4	99,02	102,89*
SD	135,17	131,98	79,062	94,891
Máximo	233,63	250,81	155,57	170,77
Mínimo	11	9,2	10	9,6

\*  $p < 0.05$  no tempo 180 dias em relação ao tempo "0".

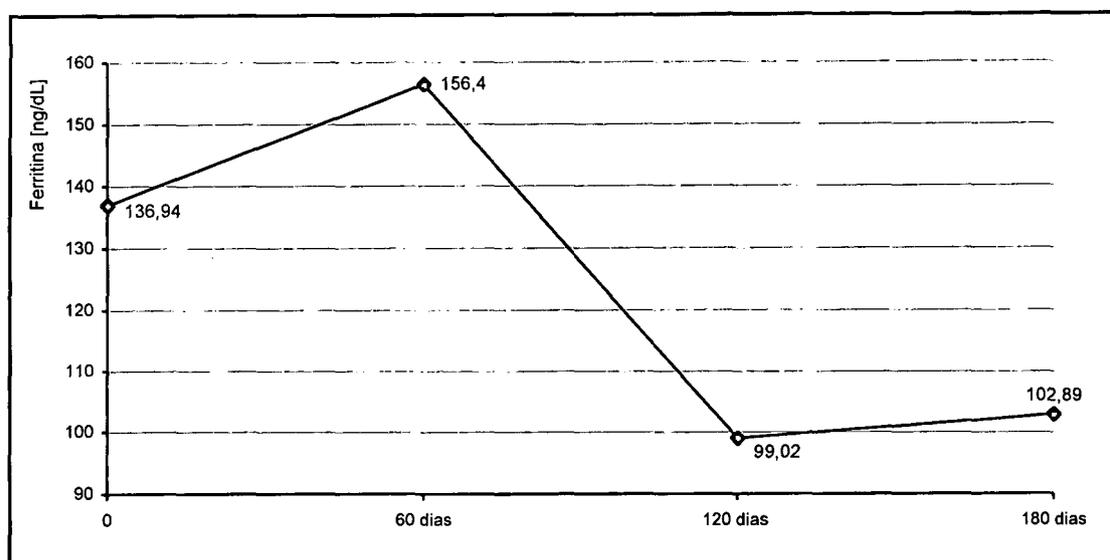


Figura 15 - Determinação da Ferritina Sérica, ng/dL, nos tempos estudados.

A ferritina constitui a principal proteína armazenadora do ferro corporal e sua redução pode ser indicativo de deficiência de ferro. A ferritina sérica pertence a um grupo de proteínas que pode elevar seus níveis em resposta a uma doença aguda e em doenças crônicas que causam depleção dos níveis de ferro. Elevados níveis de ferritina estão mais frequentemente associados com o surgimento de infecções oportunistas (SARAVINO, 1999).

Em nosso estudo os resultados de 80% dos pacientes avaliados apresentaram-se dentro dos valores de referência, compatíveis com o quadro clínico destes pacientes que não apresentavam sintomas aparentes de qualquer patologia. Quanto aos pacientes 140 e 151, não foi observado relação com o valor de outra proteína de fase aguda, como a IgM (tabela 19), porém estes pacientes apresentaram valores elevados de  $\beta$ -2 microglobulina (tabela 21).

#### 4.7 Avaliação da terapia anti-retroviral sobre os marcadores hematológicos de anemia

A tabela 11 apresenta os valores dos eritrócitos nos tempos estudados. De acordo com estes dados, podemos perceber que houve redução estatisticamente significativa ( $p < 0.001$ ) dos eritrócitos no tempo 180 dias em relação ao tempo "0" (redução média de 4.40 milhões/mm<sup>3</sup> para 3.75 milhões/mm<sup>3</sup>). Todos os pacientes apresentaram uma tendência à redução durante o estudo e um paciente (anexo XI) apresentou um quadro de anemia, confirmado pelos valores de hematócrito (tabela 12) e hemoglobina (tabela 13).

**Tabela 11 - Enumeração de eritrócitos em milhões por milímetros cúbicos, nos pacientes estudados.**

Variáveis	Eritrócitos (milhões/ mm <sup>3</sup> )			
	Tempo (dias)			
	0	60	120	180
Média	4,401	3,667	3,782	3,753*
SD	0,5246	0,7663	0,6942	0,5020
Máximo	5,18	4,48	4,8	4,44
Mínimo	4,50	3,91	3,86	3,73

\*  $p < 0.001$  no tempo 180 dias em relação ao tempo "0".

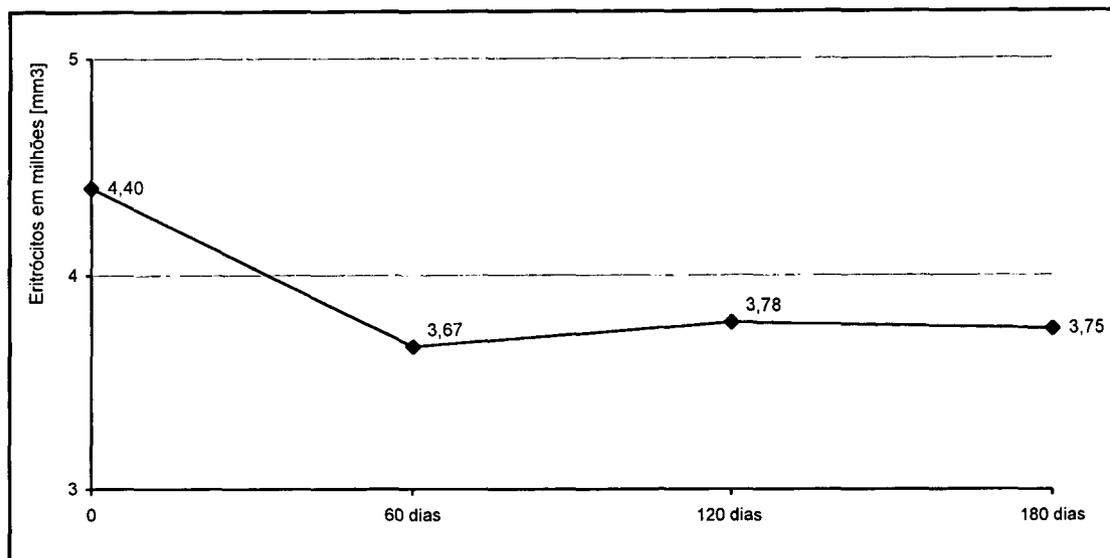


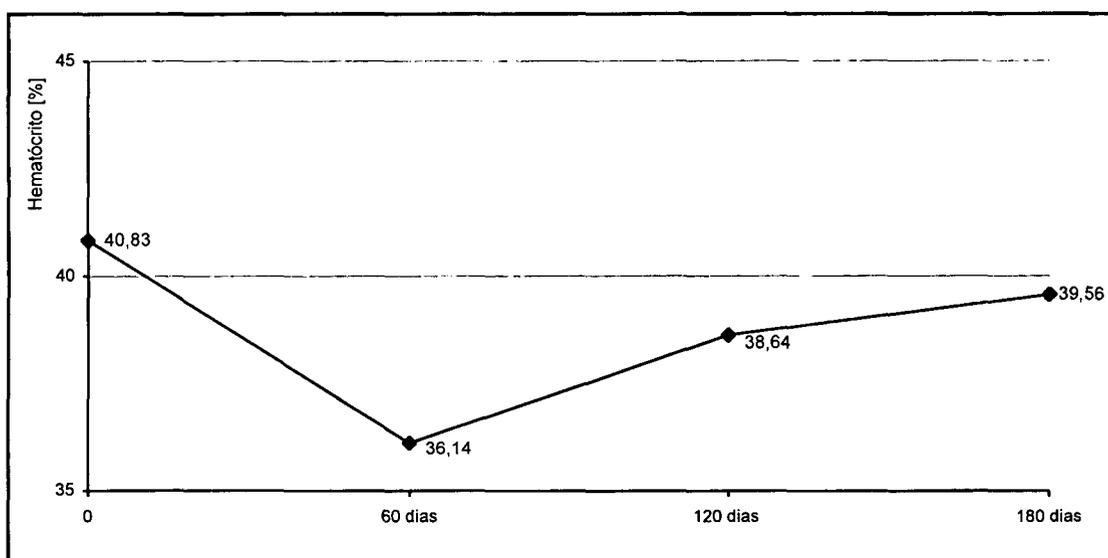
Figura 16- Enumeração de eritrócitos em milhões por milímetros cúbicos, nos pacientes estudados

Os resultados dos valores do hematócrito nos tempos estudados estão relacionados na tabela 12. Segundo estes dados, não foi observado diferença estatisticamente significativa no valor do hematócrito ( $p > 0.05$ ) no tempo 180 dias em relação ao tempo "0". Antes do início da TARV, somente um paciente (151 anexo XII) apresentou o valor do hematócrito inferior ao valor de referência (38%-50%), e esta redução foi mais evidente 60 dias após o início da terapia (17,3%), contudo após 180 dias já podemos observar um aumento moderado (34,5%).

**Tabela 12 - Determinação do valor do hematócrito sanguíneo, em porcentagem, nos tempos estudados.**

Variáveis	Hematócrito (%)			
	Tempo (dias)			
	0	60	120	180
Média <sup>1</sup>	40,83	36,14	38,64	39,56
SD	3,618	7,129	3,603	3,828
Máximo	46,7	43,1	44,2	45,5
Mínimo	36,4	17,3	32,4	34,5

<sup>1</sup>  $p > 0.05$  no tempo 180 dias em relação ao tempo "0".



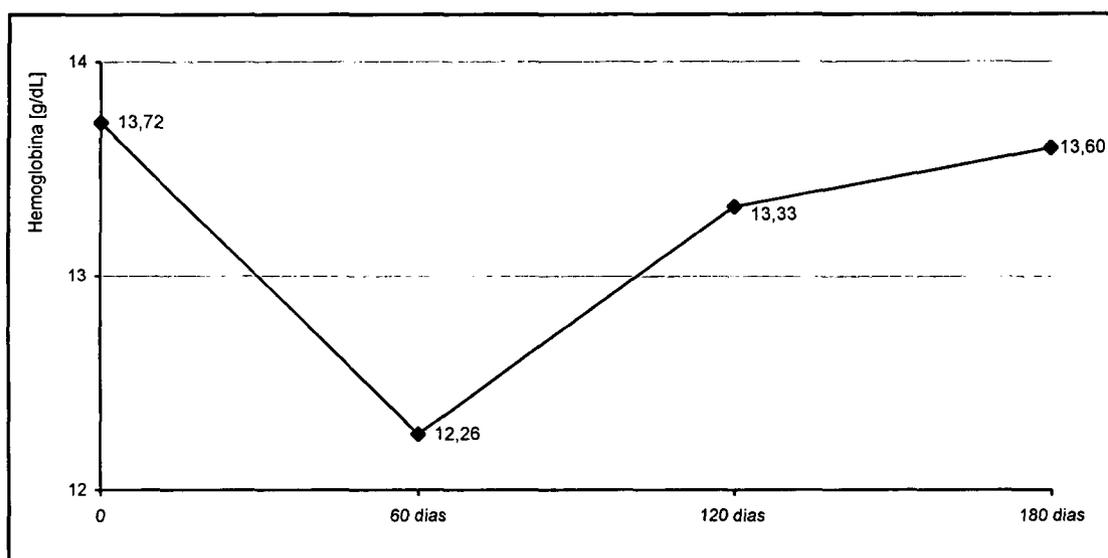
*Figura 17 - Determinação do valor do hematócrito sanguíneo, em porcentagem, nos tempos estudados.*

Na tabela 13 estão apresentados os valores de hemoglobina nos tempos estudados. Como mostra esta tabela não foi observado alterações estatisticamente significativas ( $p > 0.05$ ) do tempo 180 dias em relação ao tempo "0". Apenas um paciente (151 anexo XX), apresentou redução no tempo 60 dias, que foi compatível com os valores de hematócrito e eritrócitos, com recuperação no tempo 180 dias.

**Tabela 13 - Níveis de Hemoglobina sangüínea, em g/dL, nos tempos estudados.**

Variáveis	Hemoglobina (g/dL)			
	Tempo (dias)			
	0	60	120	180
Média <sup>1</sup>	13,72	12,26	13,33	13,60
SD	1,39	2,38	1,34	1,50
Máximo	15,2	15,3	15,5	16,0
Mínimo	12,5	6,1	11,4	11,7

<sup>1</sup>  $p > 0.05$  no tempo 180 dias em relação ao tempo "0".



**Figura 18 - Níveis de Hemoglobina sangüínea, em g/dL, nos tempos estudados.**

---

A anemia é uma complicação comum, relacionada à infecção pelo HIV, particularmente em estágios mais avançados da infecção (VANDER WERF, 2000). A anemia na infecção pelo HIV pode ser atribuída a ação direta do vírus sobre as células do parênquima medular e sobre as células progenitoras eritróides. As proteínas solúveis do HIV e algumas citocinas dentre elas o INF- $\gamma$  liberadas por células ativadas agem como inibidores do crescimento das células eritróides na medula óssea dos pacientes HIV positivos (MOORE, 1998). Não está claro se fatores solúveis agem causando mielossupressão diretamente ou se agem inibindo a síntese de fatores de crescimento. Outras etiologias da anemia em pacientes HIV positivos são: o efeito mielossupressivo de alguns fármacos anti-retrovirais especialmente a zidovudina e as infecções oportunistas, que em estágios mais avançados da infecção são as principais responsáveis pelo estabelecimento da anemia.

Em estudo realizado por Moore *et al.* (1998) que avaliou as várias formas de anemia e sua relação com a progressão da infecção e sobrevivência dos pacientes HIV positivos, demonstrou que quando a anemia ocorre, ela está associada com risco de progressão da infecção e morte e que o risco está aumentado quando se observa uma anemia progressiva ou severa.

Em nosso estudo 90% dos pacientes não apresentaram alterações nos parâmetros hematológicos marcadores de anemia após a terapia anti-retroviral. Este comportamento pode estar relacionado com o fato de nossos pacientes serem assintomáticos e apesar da anemia ser uma complicação comum na infecção pelo

---

HIV, ela parece ser mais relevante nos estágios mais avançados da infecção pelo HIV.

De acordo com os resultados dos exames laboratoriais, somente um paciente (151) apresentou anemia durante o estudo, contudo, este quadro já era evidente antes do início do tratamento e mostrou-se acentuado 60 dias após a terapia.

A relação entre hematócrito e hemoglobina foi observada em todos os resultados, porém esta mesma relação não pôde ser observada com a contagem de eritrócitos. O número de eritrócitos por milímetro cúbico, fornece uma estimativa direta do conteúdo destas células no sangue periférico. A presença de eritrócitos com tamanho alterado coexistindo com células de tamanho normal, pode produzir um aumento no valor do hematócrito. O número de eritrócitos do nosso experimento mostrou-se significativamente reduzido, porém o fato desta redução não se refletir nos valores de hematócrito se deve aos valores aumentados do volume corpuscular médio. É interessante ressaltar que todos os pacientes avaliados apresentaram uma discreta, porém progressiva redução do valor dos eritrócitos, sugerindo que o efeito mielossupressivo da TARV pode ocorrer em longo prazo.

#### **4.8 Efeito da terapia anti-retroviral sobre a contagem de Plaquetas**

Os valores das plaquetas sangüíneas nos tempos estudados, estão relacionados na tabela 14. Como podemos observar, de acordo com a análise

estatística, não houve alteração significativa ( $p > 0.05$ ) na contagem de plaquetas no tempo 180 dias em relação do tempo "0" de todos os pacientes estudados. O número de plaquetas manteve-se dentro dos valores de referência (150.000 a 350.000/mm<sup>3</sup>) no decorrer do estudo.

**Tabela 14 - Enumeração de plaquetas sangüíneas, em milhares por mm<sup>3</sup>, nos tempos estudados.**

Variáveis	Plaquetas (milhares/mm <sup>3</sup> )			
	Tempo (dias)			
	0	60	120	180
Média <sup>1</sup>	224,7	263	258,8	234,4
SD	56,81	90,99	53,14	37,51
Máximo	324	486	357	306
Mínimo	147	152	197	188

<sup>1</sup>  $p > 0.05$  no tempo 180 dias em relação ao tempo "0".

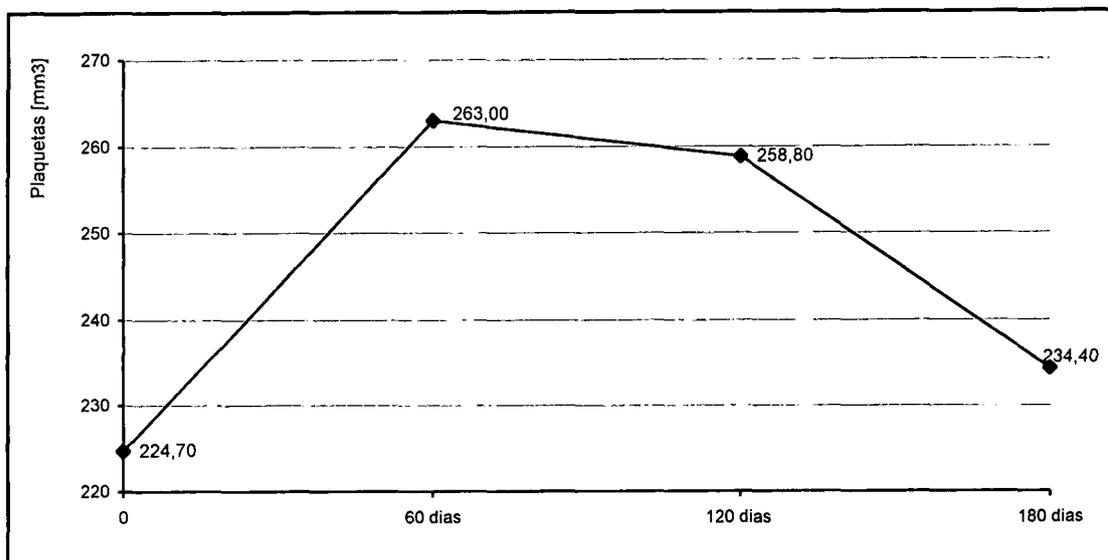


Figura 19 - Enumeração de plaquetas sanguíneas, em milhares por  $\text{mm}^3$ , nos tempos estudados.

Em relação a contagem de plaquetas, nenhuma alteração foi observada durante todo o estudo, confirmando que o efeito da TARV sobre a medula óssea não se manifestou durante os seis primeiros meses de tratamento. Sugere-se que a eficácia da terapia se traduz na replicação controlada do HIV, com reduzidos efeitos citotóxicos do vírus, tanto para as células precursoras na medula óssea, quanto para as células da circulação.

#### 4.9 Efeito da Terapia Anti-retroviral sobre os valores de VCM

Na tabela 15 estão demonstrados os valores de VCM nos tempos estudados. Como pode ser observado, houve diferença estatisticamente significativa

( $p < 0.001$ ) traduzida em um aumento médio de 91.7 fl antes do início da TARV para 106.34 fl após 180 dias de tratamento. O aumento do VCM foi observado em 8 dos 10 pacientes estudados. Um paciente (156), manteve os valores estáveis dentro dos valores de referência (80-100 fl). Somente em um paciente (149 anexo XVIII) foi observada uma tendência à redução.

**Tabela 15 – Volume Corpuscular Médio dos eritrócitos sangüíneos, em fl, nos tempos estudados.**

Volume Corpuscular Médio (fl)				
Variáveis	Tempo (dias)			
	0	60	120	180
Média	91.71	99.03	104.37	106.34*
SD	5.42	7.60	14.80	12.07
Máximo	99.7	113.3	134.4	123.7
Mínimo	83.9	86.4	84.5	88.5

\*  $p < 0.001$  no tempo 180 dias em relação ao tempo "0".

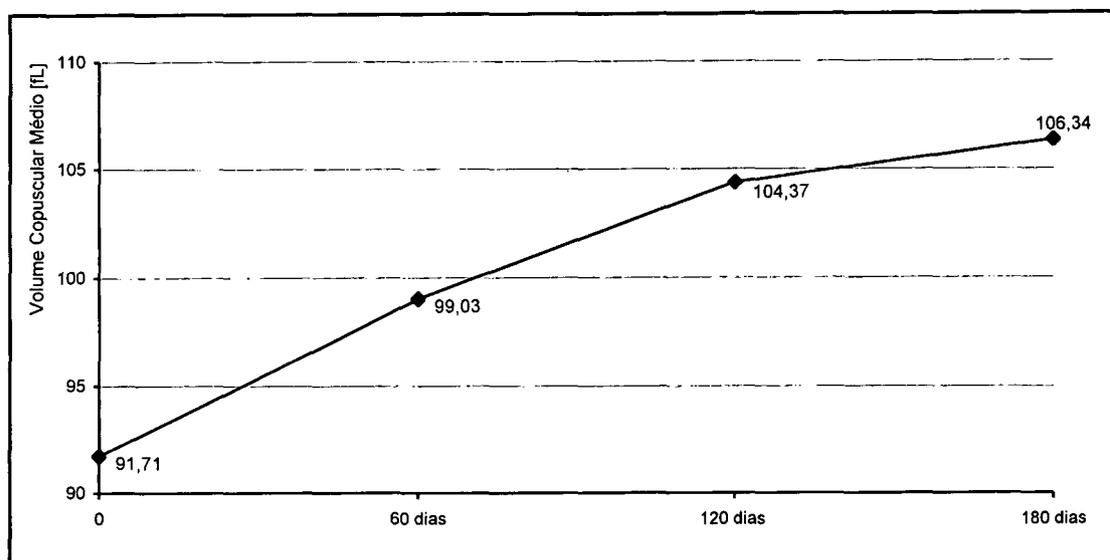


Figura 20 - Volume Corpuscular Médio (VCM) dos eritrócitos sangüíneos, em fl, nos tempos estudados.

A macrocitose é comumente definida como aumento do tamanho médio dos glóbulos vermelhos do sangue, que é resultado de falhas no processo de maturação destas células. As causas mais comuns de macrocitose incluem, deficiência de vitamina B12, hepatopatias crônicas, alcoolismo e quimioterapias citotóxicas como a zidovudina. A macrocitose é usualmente considerada uma doença benigna e está associada à anemia severa.

A maioria dos pacientes HIV positivos apresenta mais fatores de risco para a macrocitose, como deficiência de vitaminas, cirrose causada por hepatite B ou C e uso abusivo de álcool (SNOWER, 1993). Porém, neste grupo de voluntários, a macrocitose está mais comumente associada ao tratamento com zidovudina (RICHMAN, 1987).

Em nosso estudo a macrocitose mostrou-se progressiva, em 90% dos pacientes e não estava associada à anemia. A relação entre macrocitose e redução da carga viral foi observada na maioria dos pacientes com exceção do paciente 149 (normocitose e carga viral aumentada) e isto possivelmente reflete a adesão do paciente ao regime terapêutico. Em vários estudos a macrocitose foi utilizada como marcador de adesão ao tratamento (MANFREDI, 1992; GENNÉ, 2000).

O mecanismo pelo qual a zidovudina causa macrocitose ainda não foi elucidado, contudo, tem-se postulado que a zidovudina interfere com a síntese de DNA ou com a síntese de ácido fólico.

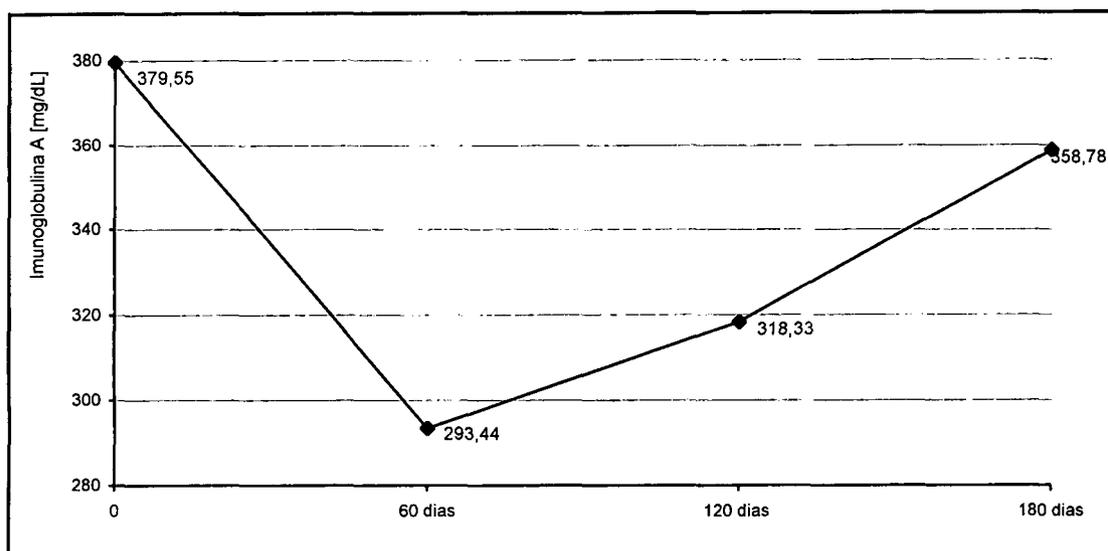
#### **4.10 Efeito da Terapia Anti-retroviral sobre as Imunoglobulinas**

A tabela 16 apresenta a concentração de IgA, nos tempos estudados. Segundo estes dados a concentração média de IgA diminuiu significativamente ( $p < 0.05$ ) no tempo 180 dias em relação ao tempo "0".

**Tabela 16 - Imunoglobulina A, em mg/dL, nos tempos estudados.**

Variáveis	Imunoglobulina A (mg/dL)			
	Tempo (dias)			
	0	60	120	180
Média	379,55	293,44	318,33	358,78*
SD	305,38	227,44	237,23	277,62
Máximo	983	774	819	993
Mínimo	119	111	124	134

\*  $p < 0.05$  no tempo 180 dias em relação ao tempo "0".



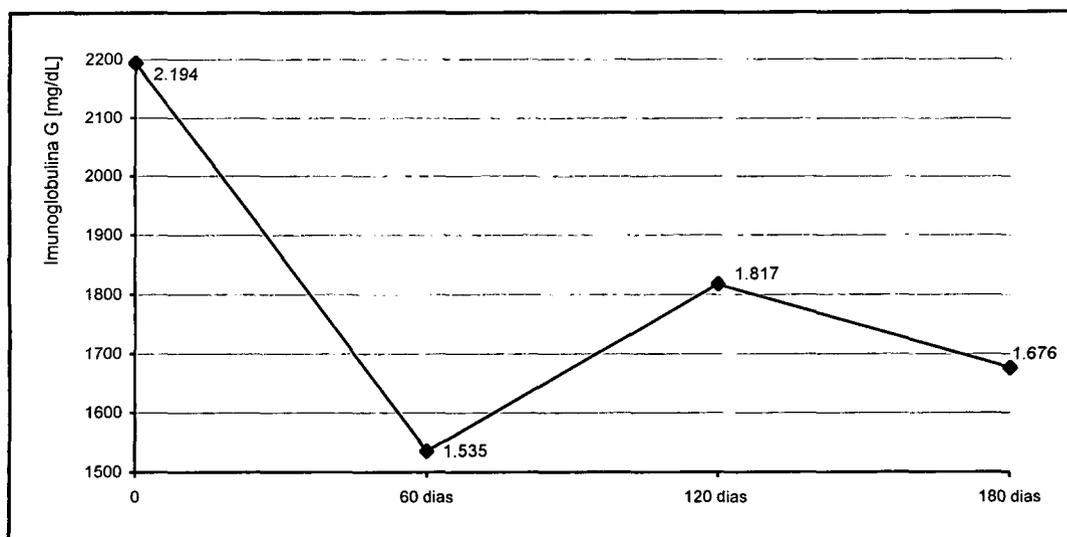
*Figura 21 - Imunoglobulina A, em mg/dL, nos tempos estudados*

A tabela 17 apresenta as concentrações de IgG nos tempos estudados. Os resultados demonstram que os valores de IgG reduziram significativamente ( $p < 0.05$ ).

**Tabela 17 - Imunoglobulina G, em mg/dL, nos tempos estudados.**

Variáveis	Imunoglobulina G (mg/dL)			
	Tempo (dias)			
	0	60	120	180
Média	2.194	1.535	1.817	1.676*
SD	608,86	412,73	404,16	515,65
Máximo	3.100	2.490	2.460	2.370
Mínimo	1.360	981	1.150	971

$p < 0.05$  no tempo 180 dias em relação ao tempo "0".



*Figura 22 - Imunoglobulina G, em mg/dL, nos tempos estudados.*

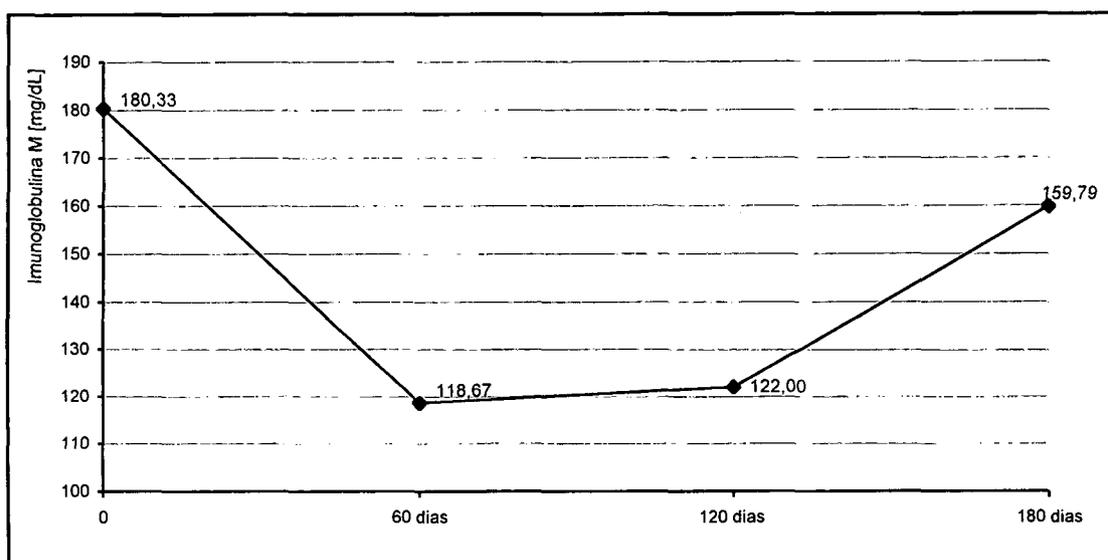
Na tabela 18 estão demonstrados os valores obtidos de IgM nos tempos estudados. De acordo com os resultados houve redução estatisticamente significativa ( $p < 0.05$ ) dos níveis de IgM no final do estudo. Os pacientes que

apresentaram a concentração de IgM elevada antes do início da terapia, exibiram redução no final do estudo, com exceção do paciente 147 (anexo XVI), cujo os resultados permaneceram aumentados.

**Tabela 18 - Imunoglobulina M, em mg/dL, nos tempos estudados.**

Variáveis	Imunoglobulina M (mg/dL)			
	Tempo (dias)			
	0	60	120	180
Média	180,33	118,67	122,00	159,79*
SD	77,00	43,68	57,95	94,37
Máximo	298	173	213	350
Mínimo	74	55	56	67

\*  $p < 0.05$  no tempo 180 dias em relação ao tempo "0".



*Figura 23 - Imunoglobulina M, em mg/dL, nos tempos estudados.*

---

A resposta imune à infecções no sangue periférico e superfícies mucosas, envolve ambas, resposta humoral e celular (BARTLETT, 1998). A infecção pelo HIV resulta em alterações nas funções imune humoral e imune celular e o mecanismo proposto para estas alterações não envolve somente a depleção das células TCD4. Proteínas solúveis e peptídeos do HIV contribuem expressivamente para a disfunção imune, inclusive em pacientes assintomáticos (MIEDEMA, 1994).

No que se refere a concentração de IgA sérica, em nosso estudo foi observado que dos 10 pacientes avaliados, os pacientes 140, 149 e 153 (anexo XIV) apresentaram valores elevados desta imunoglobulina, sendo que nestes pacientes não houve variações relevante com o uso da TARV. De uma maneira geral a TARV parece não ter exercido qualquer efeito sobre a concentração de IgA (anexo XV). Os valores elevados de IgA são indicativos de infecções localizadas em membranas mucosas. No caso dos pacientes HIV positivos, as infecções pulmonares são as mais comuns, ainda que o paciente seja assintomático. Esta pré-disposição para infecções pulmonares, está relacionada com a disfunção imune, causada pela infecção dos macrófagos alveolares pelo HIV (MOJA, 1997).

Os níveis relativamente aumentados de IgG antes do início do tratamento refletem na realidade os anticorpos contra os epitopos do HIV. De acordo com os resultados obtidos, estes níveis apresentavam -se reduzidos na maioria dos pacientes após 180 dias de tratamento (anexo XV).

Os padrões de imunoglobulinas obtidos em nosso estudo, sugerem que os pacientes avaliados apresentavam uma resposta imune satisfatória com a utilização

da TARV, refletida na atividade das células T de memória que são responsáveis pela ativação das células B para a produção de anticorpos.

#### 4.11 Avaliação da terapia anti-retroviral sobre os níveis de TNF- $\alpha$

Na tabela 19 estão apresentados os valores de TNF- $\alpha$  nos tempos estudados. A análise estatística revelou que não houve diferença estatisticamente significativa do tempo 180 dias em relação ao tempo "0" ( $p > 0.05$ ) e esta diferença não pôde ser detectada, pois os resultados de dois pacientes (139 e 149, anexo XVII) favoreceram um aumento no desvio padrão, contudo a redução média pode ser verificada (10.44 pg/ml para 7.72 pg/ml). Quando analisamos os resultados num âmbito geral podemos observar que a maioria dos pacientes apresentou redução do valor de TNF- $\alpha$  ao final do estudo, quando comparado com os valores de pré-tratamento.

**Tabela 19 – Fator de Necrose Tumoral, em pg/ml, nos tempos estudados.**

Variáveis	TNF- $\alpha$ (pg/ml)			
	Tempo (dias)			
	0	60	120	180
Média <sup>1</sup>	10,44	5,22	7,23	7,72
SD	7,43	3,22	4,08	5,49
Máximo	24,5	12,3	15,6	20,2
Mínimo	< 4	< 4	< 4	< 4

<sup>1</sup> $p > 0.05$  no tempo 180 dias em relação ao tempo "0".

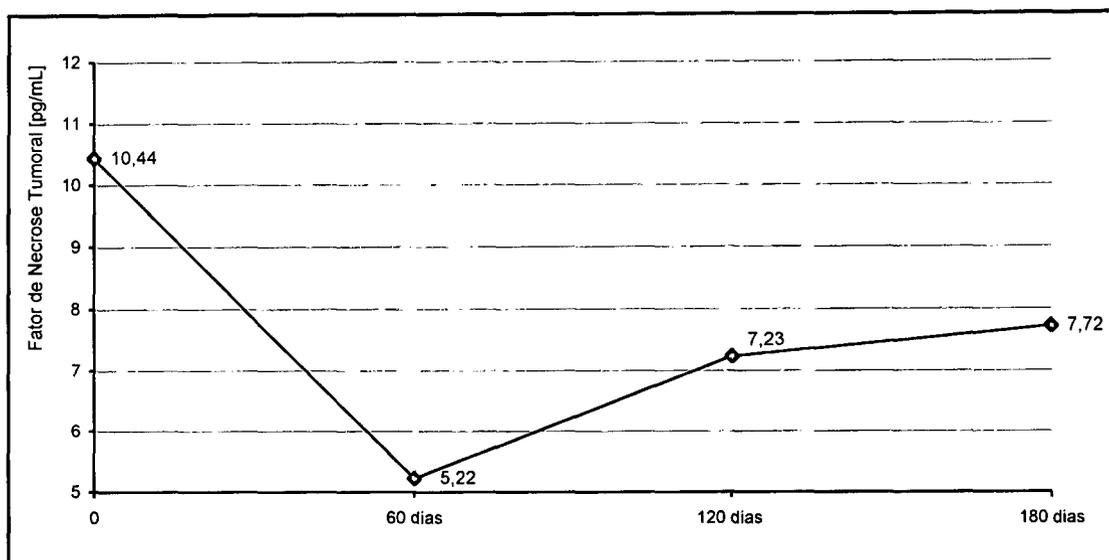


Figura 24 - Fator de Necrose Tumoral, em pg/ml, nos tempos estudados.

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) é um potente mediador da resposta inflamatória e é produzido por monócitos/macrófagos ativados e células T. Sua função biológica é mediada por receptores TNF-R e a interação do TNF- $\alpha$  com seu receptor é um importante indutor de apoptose nos linfócitos T. O aumento nos níveis de TNF- $\alpha$  podem ser observados durante várias patologias dentre elas a infecção pelo HIV (BARTHOLDY, 1999).

A evidência de ativação dos monócitos/macrófagos na infecção pelo HIV pode ser observada pelos níveis de citocinas pró-inflamatórias, incluindo o TNF- $\alpha$  secretadas por estas células. Segundo *Fischl et al.* (1997) a elevação dos níveis de TNF- $\alpha$  está associada com aumento da carga viral. Esta relação pode ser confirmada em nosso estudo, onde 90% dos pacientes apresentam no pré-tratamento níveis detectáveis de TNF- $\alpha$  e após 180 dias de tratamento observa-se

---

uma redução destes valores em 80% dos pacientes. Apesar de não guardar proporcionalidade, os resultados de TNF- $\alpha$  e carga viral apresentaram relação nos pacientes 139 com o valor de carga viral igual a 4.300 cópias/ml e TNF- $\alpha$  20.2 pg/ml e o 149 com o valor de carga viral igual a 18.000 cópias/ml e TNF- $\alpha$  12.8 pg/ml ao final do estudo.

A redução no plasma dos níveis de TNF- $\alpha$ , após o início da TARV sugerem que certas anormalidades do sistema imune como ativação crônica, podem ser estabilizadas ou até mesmo normalizadas com este tratamento.

#### **4.12 Efeito da terapia anti-retroviral sobre a dosagem de $\beta$ -2 microglobulina**

Os resultados da determinação da  $\beta$ -2 Microglobulina estão apresentados na tabela 20. De acordo com estes resultados observa-se que há redução estatisticamente significativa ( $p < 0.05$ ) no tempo 180 em relação ao tempo "0". A concentração sérica de  $\beta$ -2 Microglobulina alcançou redução média de 2.725 pg/dL para 2.300 pg/dL e todos os pacientes (anexo XIX) apresentaram resultados acima dos valores de referência (1.010 a 1.730 pg/d) antes do início da TARV.

**Tabela 20 - Determinação dos níveis de  $\beta$ -2 Microglobulina, em pg/ml, nos tempos estudados.**

Variáveis	Beta2 Microglobulina (pg/ml)			
	Tempo (dias)			
	0	60	120	180
Média	2.725	2.281	2.431	2.300 *
SD	0.537	0.562	0.663	0.687
Máximo	3.305	2.985	3.530	3.200
Mínimo	1.911	1.341	1.308	1.431

\* $p < 0.05$  no tempo 180 dias em relação ao tempo "0"

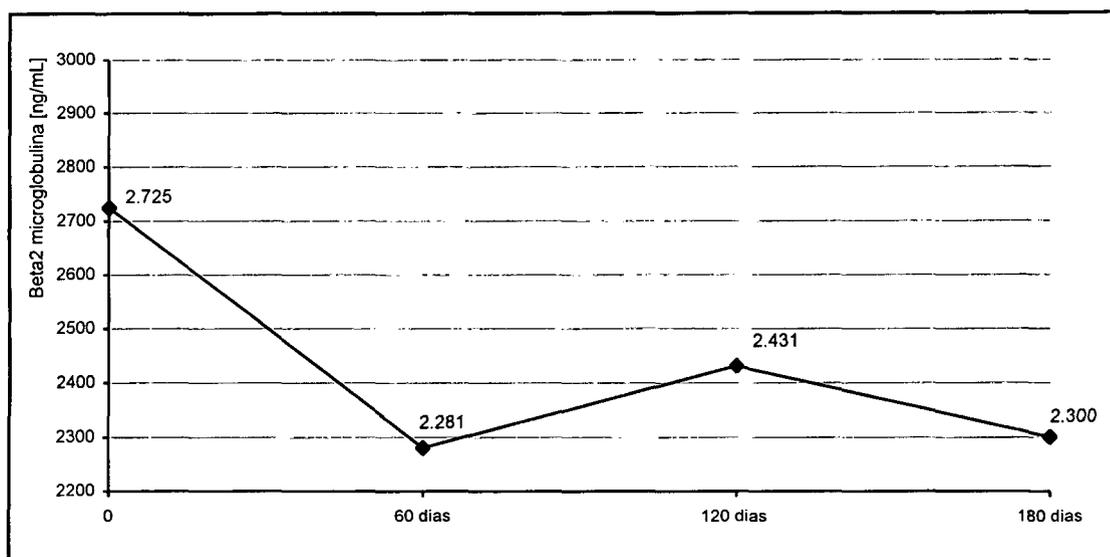


Figura 25 - Determinação dos níveis de Beta2 Microglobulina, em ng/ml, nos tempos estudados.

As células T ao contrário das células B, que reconhecem o antígeno livre através de seus receptores (imunoglobulinas), necessitam além dos seus receptores

---

(TCR), que o antígeno seja processado e os peptídeos antigênicos apresentados sobre uma molécula apresentadora de antígenos.

As moléculas MHC I e II atuam como porta-molécula para o peptídeo antigênico. O complexo MHC I está presente na superfície de numerosas células nucleadas, incluindo os linfócitos e é composto por uma cadeia pesada variável e uma cadeia leve, a  $\beta 2M$ .

Segundo Carroll *et al* (1998) a proteína tat do HIV, que é um potente transativador da transcrição viral é também um potente repressor do gene que codifica a  $\beta 2M$ , e resulta em falha na produção da molécula MHC I. Este é um dos mecanismos responsáveis pela sobrevivência da célula infectada pelo HIV, garantindo assim sua replicação. O aumento da concentração sérica de  $\beta 2M$  pode estar associado a uma replicação descontrolada do HIV.

Cerca de 50% da  $\beta 2M$  sérica, provém dos linfócitos. Por esta razão a  $\beta 2M$  é utilizada como marcador inespecífico da proliferação ou renovação dos linfócitos, como as que ocorrem na estimulação imunológica.

Em nosso estudo este parâmetro imunológico foi utilizado tanto para avaliar a destruição dos linfócitos, como para avaliar o grau de ativação imune, após o uso da TARV. Nossos resultados demonstram que antes de iniciar o tratamento, todos os pacientes apresentaram a concentração de  $\beta 2M$  superior aos valores de referência (1.010 ng/ml – 1.730 ng/ml). Estes resultados guardam relação com a carga viral e com a porcentagem de células em apoptose e pode ser observado

inclusive para dois pacientes (139 e 149 anexo XIX) que não obtiveram uma resposta positiva com a terapia, na redução da carga viral.

Com relação a viabilidade celular e a concentração de  $\beta$ 2M, é possível verificar que a redução dos níveis de  $\beta$ 2M foi proporcional a redução de células apoptóticas e que estas células possivelmente já apresentavam, além da permeabilização da membrana citoplasmática outras alterações de membrana que resultam na liberação de moléculas aderidas à sua superfície para o plasma.

---

## 5. CONCLUSÕES

Apesar de outras instituições de saúde do Brasil e outros países adotarem a terapia anti-retroviral altamente efetiva (dois inibidores da transcriptase reversa e um inibidor da protease), o regime terapêutico utilizado pelos pacientes avaliados em nosso estudo mostrou-se eficaz em 90% dos pacientes tratados. A principal vantagem deste regime terapêutico é a redução da sintomatologia causada pelos efeitos adversos, que comumente impedem o paciente aderir plenamente ao tratamento.

A avaliação de um conjunto de marcadores imune nos permitiu concluir que houve redução da ativação imune e restabelecimento da resposta imune com o tratamento.

A contagem de LTCD4, LTCD8 e quantificação da carga viral, foi confirmado em nosso estudo como marcador eficaz para avaliação do efeito da TARV.

O estudo da viabilidade celular por citometria de fluxo revelou ser um parâmetro eficiente para avaliar apoptose, que é o principal mecanismo de morte dos linfócitos do sangue periférico e dos linfonodos de pacientes HIV positivos. Esta metodologia nos permitiu constatar que a TARV reduziu a porcentagem de células em apoptose, mantendo a viabilidade das funções celulares.

A avaliação da TARV por citometria de fluxo indicou ser um marcador importante para estabelecer o início da TARV, monitorar e selecionar o regime

terapêutico adequado. De acordo com as diretrizes estabelecidas pela Organização Mundial de Saúde, com base em inúmeros estudos, o médico deverá considerar os valores de carga viral, LTCD4 e LTCD8, para iniciar a TARV. Contudo, a contagem de CD4 e CD8 reflete tão somente os valores absolutos destas células no sangue periférico e não revela o quanto destas células estão vivas, em apoptose e mortas. Com o estudo da viabilidade celular nós podemos precisar estes dados e esclarecer porque um paciente com um valor de  $CD4 < 200 \text{ cél./mm}^3$  não apresenta alterações laboratoriais e clínicas e por outro lado porque um paciente com contagem de  $CD4 > 500 \text{ cél./mm}^3$  pode apresentar tanto sinais clínicos quanto alterações laboratoriais.

## 6. REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H., POBER, J. S. **Cellular and molecular immunology**. 4<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: W. B. Saunders, p. 264-268, 2000.

ACEITUANO, E., CASTAÑÓN, S., JIMÉNEZ, C., SUBIRÁ, D., DE Górgolas, M., FERNANDEZ-GUERRERO, M., ORTÍZ, F., GARCIA, R. **Circulating immune complexes from HIV-1 patients induces apoptosis on normal lymphocytes**. *Immunology* 92(3):317-320, 1997.

AMEGLIO, F et al. **Ferritin downregulation in HIV-Infected cells**. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, New York, 9:795-798, 1993.

AMEISSEN, J. C. **Programmed cell death and AIDS: from hypothesis to experiment**. *Immunology Today* 13:388-391, 1992.

AMEISSEN, J. C., CAPRON, A. **Cell dysfunction and depletion in AIDS: the programmed cell death hypothesis**. *Immunology Today* 4:102-104, 1991.

AMEISSEN, J. C., ESTAQUIER J., IDZIOREK T., de Bels F. **Programmed cell death and AIDS pathogenesis: significance and potential mechanisms**. *Current Top Microbiology Immunology* 200:195-211, 1995.

ANDERSSON, J., FEHNIGER, T. E., PATTERSON, B. K., POTTAGE, J. A. M., JON, B. H., LANDAY, A. **Early reduction of immune activation in lymphoid tissue following highly active HIV therapy**. *AIDS* 12(11):123-129, 1998.

AUTRAN, B., CAECELAIN, G., Li, T. S. et al. **Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ T-cell Homeostasis and function in advanced HIV disease**. *Science* 277:112-116, 1997.

BANDA, N. K., BERNIER, J., KURAHARA, D. K., KURRELE, R., HAIGWOOD, N., SEKALY, R. P., FINKEL, T. H. **Crosslinking CD4 by human immunodeficiency virus gp120 primers T cells for activation inducing apoptosis**. *J Exp Med* 176:1099-1106, 1992.

BARRE-SINOSSI F, CHERMANN JC, REY F ET AL. **Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (Aids)**. *Science* 220:868-71, 1983.

BARROW, P., LEWICKI, H., HAHN, B. H., SHAW, G. M., OLDSTONE, M. B. A. **Virus-specific CD8+ cytotoxic activity associated with control of viremia in**

---

<sup>1</sup> ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 10520: apresentação de citações em documentos: procedimento. Rio de Janeiro, 1988.

**primary human immunodeficiency virus type 1 infection.** J Virol 68:6103-6110, 1994.

BARTHOLDY, C., NANSEN, A., MARKER, O., THOMSEN, A. R. **Soluble tumor necrosis factor (TNF)-receptor levels in serum as markers of anti-viral host reactivity.** Clinical And Experimental Immunology 116(2):299-306, 1999.

BARTLETT, J. A., SCHLEIFER, S., DEMETRIKOPOULOS, M. K. **Immune function in healthy adolescents.** Clin Diag Lab Immunol 5:105-113, 1998.

BAUER, J. D. **Hemoglobina, porfirina y metabolismo del hierro.** In: KAPLAN, L. A., PESCE, A. J. Química Clínica. Buenos Aires: Médica Panamericana, 721-773, 1986.

BÖHNLEIN E., Lowenthal J.W., Suekevitz M., Ballard D, W., Franza B. R., Greene W. C. **The same inducible nuclear proteins regulates mitogen activation of both the interleukin-2 receptor –alpha gene and type I HIV.** Cell 53:827-836, 1988.

BRASIL. **Boletim Epidemiológico Ministério da Saúde.** Mar. 2001.

BROCK, J. H., HALLIDAY, J. W., PIPPARD, M. J., POWELL, L. W. **Iron in infection, immunity, inflammation and neoplasia.** Iron Metabolism in Health and Disease, Saunders, Philadelphia, pp. 353-389, 1994.

BUCY, R. P., HOCKETT, R. D., DERDEYN, C. A., SAAG, M. S., SQUIRES, K., SILLERS, M., MITSUYASU, R. T., KILBY, J. M. **Initial increase in blood CD4+ lymphocytes after HIV antiretroviral therapy reflects redistribution from lymphoid tissues.** J Clin Invest 103:1391-1398, 1999.

CAAR, A., SAMARAS, K., THORISDOTTIR, A. **Diagnosis, prediction, and natural course of HIV-protease inhibitors-associated lipodystrophy, hyperlipidemia and diabetes mellitus.** Lancet 353:2093-2099, 1999.

CAGGIARI, L., ZANUSSI, S., BORTOLIN, M. T., D'ANDREA, M., NASTI, G., SIMONELLI, C., TIRELLI, U., DE PAOLI, P. **Effects of therapy with highly active anti-retroviral therapy (HAART) and IL-2 on CD4+ and CD8+ lymphocyte apoptosis in HIV+ patients.** Clin Exp Immunol 120(1):101-106, 2000.

CANNAVO, G., PAIARDINI, M., GALATI, D., CERVASI, B., MONTRONI, M., DE VICO, G., GUETARD, D., BOCCHINO, M. L., PICERNO, I., MAGNANI, M., SILVESTRI, G., Piedimonte, G. **Abnormal intracellular kinetics of cell-cycle-dependent proteins in lymphocytes from patients infected with human immunodeficiency virus: a novel link between immune activation, accelerated T-cell turnover, and high levels of apoptosis.** Blood 97:1756-1764, 2001.

CARPENTER, C. C. J., COOPER, D. A., FISCH, M., GATELL, J. M., GAZZARD, B. G., HAMMER, S. M., HIRSCH, M. S., JACOBSEN, D. M., KATZENSTEIN, D. A., MONTANER, J. S. C., RICHMAN, D. D., SAAG, M. S., SCHECHTER, M., SCHOOLEY, R. T., THOMPSON, M. A., YENI, P. G., VOLBERDING, P. A.

---

**Antiretroviral Therapy in Adults. Updated Recommendations of the International AIDS-Society-USA Panel.** JAMA 283(3):381-390, 2000.

CARROLL, I. R., WANG, J., HOWCROFT, T. K., SINGER, D. S. **HIV-Tat represses transcription of the  $\beta$ 2-microglobulin promoter.** Molecular Immunology 35(18):1171-1178, 1998.

CAVILL, I et al. **The measurement of the total volume of red cells in man: A non-radioactive approach using biotin.** Br. J. Haematol. 70: 491-495, 1988.

Centers for Disease Control. **Kaposi's Sarcoma and Pneumocystis Pneumonia among homosexual men.** New York City and California. MMWR 30 (25):305-308, 1981.

Centers for Disease Control. **Pneumocystis Pneumonia, Los Angeles.** MMWR 30 (25): 250-252, 1981.

Centers for Disease Control. **Zidovudine for the prevention of HIV transmission from mother to infant.** MMWR 43 (16): 286-286, 1994.

CHENG-MAYER, C., QUIROGA, M., TUNG, J. W., DINA, D., LEVY, J. A. **Viral determinants of human immunodeficiency virus type 1 T-cell or macrophages tropism, cytopathogenicity, and CD4 antigen modulation.** Journal of Virology 64:4390-4398, 1990.

CHOW, Y-K, HIRSCH, M. S. **Combination therapy for HIV-1 infection.** In: **Millis J., Corey, L. eds. New directions in antiviral therapy.** Nature 361:650-654, 1993.

CLAVEL, F., MANSINHO, K. CHAMARET, S. **Human immunodeficiency virus type-2 infection associated with AIDS in West Africa.** New England Journal of Medicine 316(19):1180-1185, 1987.

CLERECI, M., SARIN, A., COFFMAN, R. L., WYNN, T. A., BLATT, S. P., HENDRIX, C. W., WOLF, S. F., SHEARER, G. M., HENKART, P. A. **Type1/type2 cytokine modulation of T-cell programmed cell death as a model for human immunodeficiency virus pathogenesis.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:11811, 1994.

COFFIN J., A. HASSE, J. A. LEVY, L. MONTAGNIER, S. OROSZLAN, N. TEICH, H. TEMIN, K. TOYOSHIMA, H. VARMUS, P. VOGT, AND R. WEISS. **Human immunodeficiency viruses.** Science 232:697, 1986. (Letter).

COHEN, E. A., Terwilliger, E. F., Jalinoos, Y., Proulx, J., Sodroski, J. G., and Haseltine, W. A. **Identification of HIV-1 vpr product and function.** J. Acq. Immun. Def. Synd. 3:11-18, 1990.

COHEN, J. J. **Apoptosis: Mechanisms of life and death in immune system.** The Journal of Allergy & Clinical Immunology 103(4):548-554, 1999.

COHEN, J. **The transfusion studies.** Science 226 (5191): 1646, 1994.

CONNOR, E. M. **Reduction of maternal-infant transmission of human immunodeficiency virus type 1 with zidovudine treatment.** *Pediatric Aids Clinical Trials Group Protocol 079 Study Group.* N Engl J Med 331(18):1173-1180, 1994.

COSTA, N. J. S. **As mulheres e AIDS** (dissertação de mestrado). São Paulo. SP: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (USP), 1994.

CULLEN BR. Greene WC. **Regulatory pathways governing HIV-1 replication.** Cell 58:423-6, 1989.

D'ALESSANDRO, A., M., RINALDI, A. C., D'ANDREA, G., BRISDELLI, F., DI CICCIO, L., DI GIULIO, A., ORATORE, A., BOZZI, A. **Evidences that zidovudine (AZT) could not directly responsible for iron overload in AZT-treated patients: na in vitro study.** Clinica Chimica Acta 300(12): 119-130 2000.

D'SOUZA, M. P., CAIRNS, J. S., Plaeger, S. F. JAMA 284(2):215-222, 2000.

DAAR Es Et Al. **Transient high levels of viremia in patients with primary human immunodeficiency virus type 1** Infect. N Engl J Med 324(14): p. 961-4, 1991.

DALAKAS, M. C., Pezeshkpour, G. H., Laukaitis, J. P., Cohen B., Griffin, J. L. **Mitochondrial myopathy caused by long-term zidovudine therapy.** N Engl J Med 322:1098-1105, 1990.

DALGLEISH AG. Beverley PCL. CLAPHAM PR. Crawford DH. Graeves MF. WEISS RA. **The CD4 (T4) antigen is na essential component of the receptor for the AIDS retrovirus.** Nature 312:763-7, 1984.

De SHAZO, R. D., ANDEZ, W. A., NORDBERG, J. **Na immunologic evaluation of hemophilic patients and their wives: Relationships to the acquired immunodeficiency syndrome.** Ann. Intern. Med., Philadelphia, 99:159-167, 1983.

DEAN, M., CARRINGTON, M., WINKLER, C. et al. **Genetic restriction of HIV-1 and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene.** Science 273:1856-1862, 1996.

DELACRETAZ, F., PEREY, L., SCHMIDT, P. M. **Histopathology of bone marrow in human immunodeficiency virus infection.** Virchows Arch. A., Paris, 90: 357-361, 1993.

DRAGIC, T., LITWIN, V., ALLAWAY, G. P. **HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5.** Nature 381:667-673, 1996.

DUKE, R. C., COHEN, J. J. **IL-2 Addiction: Withdrawal of growth factor activates a suicide program in dependent T cell.** Lymphokine Res 5:289-299, 1986.

EGGER, M., HIRSCHL, B., FRANCIOLI, P. et al. **Impact of new antiretroviral combination therapies in HIV infected patients in Switzerland: prospective multicentre study.** BMJ 315:1194-1199, 1997.

---

EMBRESTSON J et al. **Massive convert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS.** *Nature* 362(6418): p. 359-62, 1993.

ERB, P., BATTEGAY, M., ZIMMERLI, W., RICKENBACH, M., EGGER, M. **Effect of antiretroviral therapy on viral load, CD4 cell count, and progression to acquired immunodeficiency virus-infected cohort.** *Arch Intern Med* 160(8):1134-1140, 2000.

ERSLEV, A. J., BEUTLER, E. **Production and destruction of erythrocytes.** In: **BEUTLER, E. et al. Williams Hematology.** New York: MacGraw-Hill, Inc. 5<sup>th</sup> ed. 425-440, 1995.

FARTHING, C. R., BROWN, S. E., STAUGHTON, R. C. D. **Atlas colorido de AIDS e da doença do HIV.** Artes Médicas, 6-88, 1989.

FARZADAN, H., HOOVER, D. R., ASTEMBORKI J., et al, **Sex differences in HIV-1 viral load and progression to AIDS.** *Lancet* 352:1510-1514, 1998.

FAUCI A.S. **The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis.** *Science* 239: 617-22, 1988.

FAUCI, A. S. **Host factors and the pathogenesis of HIV-induced disease.** *Nature* 384:529-534, 1996.

FINKEL, T. H., BANDA, N. K. **Indirect mechanisms of HIV pathogenesis: How does HIV kill T cell?** *Current Opinion Immunology* 6:605-615, 1994.

FINZI, D., HERMANKOVA, M., PIERSON, T., CARRUTH, L. M., BUCK, C., CHAISSON, R. E., QUINN, T. C., CHADWICK, K., MARGOLICK, J., BROOKMEYER, R., GALLANT, J., MARKOWITZ, M., HO, D. D., RICHMAN, D. D., SILICIANO, R. F. **Identification of reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy.** *Science* 278:1295-1300, 1997.

FISCHER, A. G., RATNER, L., MITSUYA, H., MARSELLE, L. M., HARPER M. E., BRODER, S., GALLO, R. C., AND WONG-STAAAL, F. **Infectious mutants of HTLV-III with changes in the 3' region and markedly reduced cytopathic effects.** *Science* 233:655-658, 1986.

FISCHL, M. A., RICHMAN, D. D., CAUSEY, D. M., GRIECO, M. H., Bryson, Y., MILDVAN, D., LASKIN, O. L., GROOPMAN, J. E., VOLBERDING, P. A., SCHOOLEY, R. T., JACKSON, G. G., DURACK, D. T. **Prolonged Zidovudine therapy in patients with AIDS and advanced AIDS-Related complex.** *JAMA* 262(17):2405-2410, 1989.

FISCHL, M. A., RICHMAN, D. D., GRIECO, M. H. **The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex.** *N Engl J Med* 317:185-191, 1987.

FLEURY, S., RIZZARDI, G. P., CHAPUIS, A., TAMBUSI, G., KNABDENHANS, C., SIMEONI, E., MEUWLY, J. Y., CORPATAUX, J. M., LAZZARIN, A., MIEDEMA, F., PANTALEO, G. **Long-term kinetics of T cell production in HIV-infected subjects treated with highly active antiretroviral therapy.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: (10)5393-5398, 2000.

FRANCO, J. M., LEÓN-LEAL, J. A., LEAL, M., CANO-RODRIGUEZ, A., PINEDA, J. A., MACÍAS, J., RUBIO, A., Rey, C., SANCHEZ, B., LISSEN, E. **CD4+ and CD8+ T lymphocyte regeneration after anti-retroviral therapy in HIV-1 infected children and adult patients.** Clin Exp Immunol 119(3):493-498, 2000.

FUCHS, D., ZANGERLE, R., ARTNER-DWORSAK, E., WEISS, G., FRITSCH, P., TILZ, G. P., DIERICH, M. P., WACHTER, H. **Association between immune activation, changes of iron metabolism and anaemia in patients with HIV infection.** Eur. J. Haematol 50:90-94, 1993.

FURMAM, P. A., FYFE, J. A., ST CLAIR, M. H., **Phosphorylation of 3'- azido-3'-dooxythymidine and selective interation of the 5'-triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase.** Proc Natl Acad Sci U S A 83:8333-8337, 1986.

FURTADO, M., CALLAWAY, D., PHAIR, J., KUSTMAN, K., STANTON, J., MACKEN, C., PERELSON, A., WOLINSKY, S. **Persistence of HIV transcription in peripheral blood mononuclear cells in patients receiving potent antiretroviral therapy.** New Engl J Med 340:1614-1622, 1999.

GALLO RC, SALAHUDDIN SZ, POPOVIC M ET AL. **Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV III) from patients with Aids and at risk for Aids.** Science 224:500-3, 1984.

GARRETT, E., TILEY, L., and CULLEN, B., **Rev activates expression of the human immunodeficiency virus type 1 vif and vpr gene products.** J. Virol. 65: 1653-1657, 1991.

GELDERBLOM HR. HAUSMANN EHS. Ozel M. Pauli G. Kock MA. **Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins.** Virology 156: 171-6, 1987.

GELEZIUNAS, R., SCHIPPER, H. M. **Phatogenesis and therapy of HIV-1 infection of the central nervous system.** Aids 6:1411-1426, 1992.

GOLDE, D. W. **Production, distribution and fate of neutrophils.** In: WILLIAMS, W. J et al. Hematology. New York, 4<sup>th</sup> ed., 795-800, 1990.

GOLDIN, R. D., WILKINS, M., DOURAKIS, S., PARKIN, J., LINDLEY, R. **Iron overload in multiply transfused patients who are HIV seropositive.** J Clin Pathol 46:1036-1038, 1993.

GOLDSBY, R. A., KINDT, T. J., OSBORNE, B. A. **Kuby Immunology.** Plubished by W. H. Freeman and Company 4<sup>th</sup> ed. 27-41, 467-493, 2000.

GORDEUK, V. R., DELANGHE, J. R., LANGLOIS, M. R., BOELAERT, J. R. **Iron status and outcome of HIV infection: na overview.** J Clin Virol 20(3):111-115, 2001.

GOTTILINGER, H.G., DORFMAN, T., SODROSKI, J. G., and Haseltine, W.<sup>a</sup> **Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particule release.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 In press, 1991.

GOUGEON, M. L., LECOUEUR, H., DULIOUST, A., ENOUF, M. G., CROUVOISER, M., GOUJARD, C., DEBORD, T., Montagnier, L. **Programmed cell death in peripheral lymphocytes from HIV-infected persons: the increased susceptibility to apoptosis of CD4+ and CD8+ T cells correlates with lymphocyte activation na with disease progression.** Journal of Immunology 156:3509-3520, 1996.

GOUGEON, M. L., LEDRU, E., LECOEUR, H., GARCIA, S. **T cell apoptosis in HIV infection: mechanisms and relevance for AIDS pathogenesis.** Results Probl Cell Diff 24:233-248, 1998.

GOUGEON, M. L., MONTANIER, L. **Apoptosis in AIDS.** Science 260:1269-1270, 1993.

GRAY, C. M., SHAPIRO, J. M., ALTMAN, J., LAWRENCE, M., CROMPTON, M., MERIGAN, T. C. **Antiretroviral drug-mediated supression of HIV-results in loss of CD8+ T cell receptor skewing and reduced frequency of epitope-specific CD8+ cells.** In: Program and abstracts of the 5<sup>th</sup> Conference on Retroviruses na Opportunistic Infections; Chicago, Ill; February 1-5, 1998. Abstract 19.

GREENE W. C. **The molecular biology of human immunodeficiency vyrus type 1 infection.** N Engl J Med 324:308-315, 1991.

GROOPMAN, J. E. **Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in human immunodeficiency virus disiasse.** Semin Hematol 27: suppl 3: 8-14, 1990.

GUILICK, R. M., MELLORS, J. W., HAVLIR, D., ERON, J. J., GONZALEZ, C., MCMAHON, D., JONAS, L., MEIBOHN, A., HOLDER, D., SCHLEIF, W, A. CONDRA, J. H., EMINI, E. A., ISAACS, R., CHODAKEWITZ, A., RICHMAN, D. D. **Simultaneous vs sequential initiation of therapy with indinavir, zidovudine, and lamivudine for HIV-1 infection.** JAMA 280:35-41, 1998.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C., CROSS, C. E. **Free radicals, antioxidants and human disease, where are we now?.** J Lab Clin Med 119:598-620, 1992.

HASELTINE WA. **Molecular biology of the human immunodeficiency virus type 1.** FASEB J 5:2349-2360, 1991.

HILGARTNER, M. W. **Aids and hemophilia.** N Engl J Med 317(18):1153-1157, 1987

HIRSCH, M. S., D'AQUILA, R. T. **Drug therapy: therapy for human immunodeficiency virus infection.** N Engl J Med 328(23):1686-1695, 1993.

HO D. D., NEUMANN, A. U., PERELSON, A. S., CHEN, W., LEONARD, J.M., MARKOWITZ, M. **Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV infection.** Nature 373(6510); p.123-6, 1995.

HO.D.D, Moudgil T&alam M. **Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 in the blood of infected persons.** N Engl J Med 321(24): p. 1621-5, 1989.

HOGG, R. S., HEATH, K. V., YIP, B. et al. **Improved survival among HIV-infected individuals following initiation of antiretroviral therapy.** JAMA 279:450-454, 1998.

JOHNSON, N., PARKIN, J. M. **Anti-retroviral therapy reverses HIV-associated abnormalities in lymphocyte apoptosis.** Clinical and Experimental Immunology 133(2):229-234, 1998.

KALAMS, S. A., Walker B. D. **The critical need for CD4 help in maintaining effective cytotoxic T lymphocyte responses.** J Exp medicine 188:2199-2204, 1998.

KERR, J. F., WYLLIE, A. H., CURRIE, A. R. **Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.** Br Journal of cancer 26:239-257, 1972.

KLATZMANN D. CHAMPAGNE E. CHAMARET S. et al. **T lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV.** Nature 312:767-8, 1984.

KLIMKAIT, T. STREBEL, K., HOGGAN, M. D., MARTIN, M. A., AND ORESTEIN, J. M. **The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release.** J. Virol. 64, 621-629, 1990.

KOZARSKY, K., PENMAN, M., BARISIPOUR, L., HASELTINE, W., SODROSKI, J., and Kriger, M. **Glycosylation and processing of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein.** J AIDS 2:163-169, 1989.

KRÄUSCHI, P. E. S., BÜRGIN D., BIEDERMANN K. et al. **Quantitative anti-p24 determinations can predict the risk of vertical transmission.** Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes 7:261-264, 1994.

LANE, H. C., DEPPER, J. M., GREENE, W. C., WHALEN, G., WALDMANN, T. A., FAUCI, A. S. **Qualitative analysis of immune function in patients with acquired immunodeficiency syndrome. Evidence for a selective defect in soluble antigen recognition.** New England Journal of Medicine 313:79-82, 1985.

LARDER, B. A., DARBY, G., RICHMAN, D. D. **HIV with reduced sensitivity to zidovudine (AZT) isolated during prolonged therapy.** Science 243:1731-1734, 1989.

LARDER, B. A., DARBY, G., RICHMAN, D. **HIV with reduced sensitivity to Zidovudine (AZT) isolated during prolonged therapy.** Science 243:1731-1734, 1989.

LEDERGERBER, B., EGGER, M., ERARD, V., WEBER, R., et al. **AIDS-related opportunistic occurring after initiation of potent antiretroviral therapy.** JAMA 282(23): 2220-2226, 1999.

LI, C.J., FRIEDMAN, D. J., WANG, C. **Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV tat protein.** Science 268:429-431, 1995.

LIFSON, A. R. **Transmission of the human immunodeficiency virus.** In: De Vita Jr V. T., Hellman S., Rosenberg, S. A. AIDS: etiology, diagnosis, treatment and prevention. J. B. Lippincott Company, Philadelphia, 1992.

LIFSON, J. D., FEINBERG, M. R., REYS, G. R., RABIN, L., BASIRIPOUR, B., CHAKRABARTI, S., MOSS, B., WONG-STAAAL, F., STEIMER, K. S., and ENGLEMAN, E. G. **Induction of CD4-dependent cell fusion by HTLV-III/LAV envelope glycoprotein.** Nature 323:725-728, 1986.

LORENZI, T. F. **Manual de Hematologia, Propedêutica e clínica.** Rio de Janeiro: Medsi – Médica e Científica Ltda, 1-130, 1992.

LYERLY, H. K., MATTHEWS, T. J. Langlois, A. J., BOLOGNESI, D. P., Weinhold, K. J. **Humann T-cell lymphotropic virus IIIB glycoprotein (gp120) bound to CD4 determinants on noemal lymphocytes and expressed by infected cells serves as target for immune attack.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:4601-4610, 1987.

MANFRIED, R., RICCHI, E., COSTIGLIOLA, P. **Monitoring of several hematological parameters of the erytroid series in patients with HIV infection treated with zidovudine.** Recenti Prog Med 83:361-366, 1992.

MARSCHNER, I. C., COLLIER, A. C., COOMBS, R. W. **Use of changes in plasma levels of human immunodeficiency virus type 1 RNA to asses the clinical benefit of antiretroviral therapy.** J Infect Dis. 144:40-47, 1998.

MCCOUBREY, W. K. JR., EWING, J. R., MAINES, M. D. **Human hemoxygenase-2: Characterization and expression of a full-length c DNA and evidence suggesting that the two HO-2 transcripts may differ by choice of polyadenylation signal.** Arch. Biochem. Biophys. Amsterdam, 295:13-18, 1992.

MELLORS, J., MUNOZ, A. M., GIORGI, J. V. **Plasma viaral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection.** Ann Intern Med. 126:946-954, 1997.

MENITOVE, J. E., ASTER, R. H. CASPER, J. T. **T-lymphocyte subpopulations in patients with classical hemophilia treated with cryoprecipitate and lyophilized concentrates.** N. Engl. J. Med., Boston, 308: 83-86, 1983.

MEYAARD, L., SCHUITEMAKER, H., MIEDEMA, F. **T cell dysfunction in HIV infection: anergy due to defective antigen-presenting cell function?** Immunology Today 14:163, 1993.

MEYAARD, L., OTTO, S. A., JONKER, R. R., MIJNSTER, M. J., KEET, R. P. M., MIEDEMA, F. **Programmed death of T cells in HIV-1 infection.** *Science* 257:217-219, 1992.

MIEDEMA, F., MEYAARD, L., KOOT, M. **Changing virus-host interactions in the course of HIV infection.** *Immunol Rev* 140:35-72, 1994.

MOCROFT AJ ET AL. **Staging system for clinical Aids patients.** Royal Free/Chelsea and Westminster Hospitals Collaborative Group. *Lancet* 346(8966):12-7, 1995.

MOJA, P. H., JALIL, A., QUESNEL, A., PEROL, M., COTTE, L., LIVROZET, J. M., BOIBIEUX, A., CHAMSON, A., VERGNON, J., LUCHT, F., TRAN, R., POZZETO, B., GENIN, C. **Humoral immune response with the lung in HIV-1 infection.** *Clin Exp Immunol* 110(3):341-348, 1997.

MONDELLI, M.U., PARKS, D. E., CHISARI, F. V. **Cellular kinetics of lymphocytes and plasma cells.** In: WILLIAMS, W. J. *Hematology.* New York: MacGraw-Hill, 4<sup>th</sup> ed., 945-949, 1990.

MONTAGNIER, L., M. L., GOUGEON, Oliver, R., GARCIA, S., GUETARD, D., DAUGET, D., BECHET, J. M., Adams, M. **"Science Challenging AIDS."** Basel, Karger p.51, 1992.

MOORE, R. D., KERULY, J. C. **Anemia and survival in HIV infection.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 19:29-33, 1998.

MORETTI, S., MARCELLINI, S., BOSCHINI, A., FAMULARO, G., SANTINI, G., ALESSE, E., STEINBERG, S. M., CIFONE, M. G., KROEMER, G., DE SIMONE, C. **Apoptosis and apoptosis-associated perturbations of peripheral blood lymphocytes during HIV infection: comparison between AIDS patients and asymptomatic long-term non-progressors.** *Clinical Experimental Immunology* 122(3):364-373, 2000.

MORGAN, E. L., WEIGLE, W. O. **Biological activities residing in the Fc region of immunoglobulin.** *Adv. Immunol.* New York, 40:61-65, 1987.

NABEL, G., BALTIMORE, D. **An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells.** *Nature* 36:711-713, 1987.

NAGATA, S. **Apoptosis by death factor.** *Cell* 88:355-365, 1997.

NATAJARAN, V., BOSCHE, M., METCALF J., WARD, D., LANE, H. C., Kovacs, J. **HIV-replication in patients with indetectable plasma virus receiving HAART.** *Lancet* 353:119-120, 1999.

NEWELL, M. K., HAUGHN, L. J., MAROUN C. R., JULIUS, M. H. **Death of mature T cells by separate ligation of CD4 and T-receptor for antigen.** *Nature* 347: 286-289, 1990 –

NOKTA, M., ROSSERO, R., NICHOLS, J., ROSEMBAUM, M., POLLARD, R. B. **Effect of ddl, stavudine and hydroxyurea therapy on apoptosis in CD45RA+ and CD45RO+ T lymphocyte subpopulations.** AIDS Res Hum Retrovir 15:255-264, 1999.

O'BRIEN, T. R., BLATTNER, W. A., WATERS, D. **Serum HIV-1 RNA levels and time to development of AIDS in Multicenter Hemophilia Cohort Study.** JAMA. 276:105-110, 1996.

OLDSTONE, M. B. A. **HIV versus cytotoxic T lymphocytes – the war being lost.** N Engl J of Med. 337(18)1306-1308, 1997.

OROSZLAN, S. and Luftig, RB. **Retroviras proteinases.** In **current Topcs in Microbiology and Immunology Springer-Verlag, Berlin, 1990.**

OSTERTAG, W., ROESLER, G., KRIEG, C. J., et al. **Indution of endogenous virus and of thymidine kinase by bromodeoxyuridine in cell cultures transformed by Friend virus.** Proc Natl Acad Sci U S A 71:4980-4985, 1974.

PAKKER, N. G., NOTERMANS, D. W., DE BOER, R. J. et al. **Biphasic kinetics of peripheral blood T-cells after triple combination therapy in HIV-infection: a composite of redistribuiton and proliferation.** Nature Med 4:208-214, 1998.

PAKKER, N. G., ROOS, M. T., VAN LEEUWEN, L. R. **Patterns of T-cell repopulation, virus load reduction, and restoration of T-cell function in HIV-infected persons during therapy with different antiretroviral agents.** J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovir 16:318-326, 1997.

PAKKER, N., NOTERMANS, D. W., DE BOER, R. J. **BYPHASIC kinetics of peripheral blood T cells after triple combination therapy in infection: a composite of redistribution and proliferation.** Nature Med 4:208-214, 1998.

PANTALEO G ET AL. **HIV infection is active and progressive in linphoid tissue during the clinically latent stage oj disease.** Nature 362(6418):p.355-8, 1993.

PANTALEO G., FAUCI, A. S. **Apoptosis in HIV infection.** Nature Med 1:111-120, 1995.

PANTALEO, G., GRAZIOSI, C., FAUCI, A. S. **The immunophatogenesis of human immunodeficiency virus infection.** N Engl J Med 328:327-336, 1993.

PARHAN, P. **The Immune System.** Elsevier Science p.20-32, 2000.

PEARSON, T.C. **Interpretation of measured red cell mass and plasma values in males with elevated venous PCV.** Scand. J. Haematol., Budapest, 33:68-72, 1984.

PERKOCHA, L. A., RODGERS, G. M. **Hematologic aspects of human Immunodeficiency Virus Infection: Laboratory and clinical considerations.** Ann. J. Hemtol., San Francisco, 29:94-105, 1988.

---

POLI, G., ORENSTEIN, J. M., KINTER, A., FOLKS, T. M., FAUCI, A. S. **Interferon- $\gamma$  but not AZT supresses HIV, expression in chronically infected cell lines.** Science 244:575-577, 1989.

POLK, B. F., FOX, R., BOOKMEYER, R. **Predictos of the acquired immunodeficiency syndrome developing in a cohort of seropositive homosexual men.** N England J Med 616:61-66, 1987.

POPOVIC. M., SARNGADHARAN, M. G., READ, E., and GALLO, R. C. **Detection, isolation and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS.** Science 224:297-300, 1984.

POWDERLY, W. G., LANDAY, A., LEDERMAN, M. M. **Recovery of immune system with antiretroviral therapy: the end of opportunism?** JAMA 280(1):72-77, 1998.

PRATY, E., GORLA, R., MALACARNE, F. **Study of spontaneous apoptosis in HIV+ patients: correlation with clinical progression and T cells loss.** AIDS Res Hum Retrovir 13:1501-1508, 1997.

RARICK, M. U., LOUREIRO, C., GROSHEN, S. **Serum erythropoietin titers in patients with human immunodeficiency virus (HIV) infection and anemia.** J Acquir Immune Defic Syndr 4:593-597, 1991.

RATNOFF, O. D et al. **Coincident classic hemophilia and "idiopatic" thrombocytopenic purpura in patients under treatment with concetrates of antihemophilic factor (factor VIII).** N. Engl. J. Med., Boston, 308: 439-446, 1983.

RICHMAN, D. D., FISCHL M. A., GRIECO, M. H. **The toxicity of azidothymidine (AZT) in treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex: a double-blind, placebo-controlled trial.** N Engl J Med 317:192-197, 1987.

RICHMAN, D. D., GRIMES, J. M., LAGAKOS, S. W. **Effect of stage of disease and drug dose on zidovudine susceptibilities of isolates of human immunodeficiency virus.** J Acquir Immune Defic Syndr 3:743-746, 1990.

ROEDERER, M. **Getting to de HAART of T cell dynamics.** Nature Med 4:145-156, 1998.

ROITT, T. M., BROSTOFF, J., MALE, D. K. **Immunology.** Barcelona: Plubished by Mosby, printed by Grafos S. A., 4<sup>th</sup> ed., 1-40, 1996.

ROSEMBERB Y. J., ANDERSON A. O., PABST, R. **HIV-induced decline in blood CD4/CD8 ratios: viral killing or altered lymphocyte trafficking?** Immunology Today 19:10-17, 1998.

ROSENBERG, Z. F., FAUCI, A. S. **Activation of latent HIV infection.** J NIH Res 2:41-45, 1990.

- 
- ROSENBERG, Z. F., FAUCI, A. S. **The immunopathogenesis of HIV infection.** *Adv Immunol.* 47:377-431, 1989.
- RUIZ, M. E., CICALA, C., ARTHOS, J. **Peripheral blood-derived CD34+ progenitor cells: CXC chemokine receptor 4 and CC chemokine receptor 5 expression and infection by HIV.** *J Immunol* 161:4169-4176, 1998.
- SAIKUMAR, P., DONG, Z., MIKHAILOV, V., DENTON, M., WEINBERG, J. M., VENKATACHALAM, M. A. **Apoptosis: Definition, mechanisms, and relevance to disease.** *The American Journal of Medicine* 107(5):489-506, 1999.
- SAMUELSSON, A., BROSTON, C., VAN DIJK, N., SONNENBORG, A., CHIODI, F. **Apoptosis of CD4 and CD19 cells during HIV-1 infection. Correlation with clinical progression, viral load and loss of humoral immunity.** *Virology* 238:180-188, 1997.
- SARAVINO, A, PESCARMONA, G. P., BOELAERT, J. R. **Iron metabolism and HIV infection: reciprocal interactions with potentially harmful consequences.** *Cell Biochem Funct*, 17:279-287, 1999.
- SASTRY, K. J., MARIN, M. C., NEHETE, P. N., et al. **Expression of human immunodeficiency virus type 1 tat results in down-regulation of bcl-2 and induction of apoptosis in haemopoietic cells.** *Oncogene* 13:487-493, 1996.
- SCADDEN, D. T., ZON, L. I., GROOPMAN, J. E. **Pathophysiology and management of HIV-associated hematologic disorders.** *Blood* 74:1455-1463, 1989.
- SELLINS, K. S., COHEN, J. J. **Gene induction by gamma-irradiation leads to DNA fragmentation in lymphocytes.** *J Immunol.* 139:3199-3206, 1999.
- SHEARER, G. M., BERNSTEIN, D. C., TUNG, K. S. K., VIA, C. S., REDFIELD, R., SALAHUDDIN, S. Z., GALLO, R. C. **A model for the selective loss of major histocompatibility complex self-restricted T cell immune responses during the development of acquired immune deficiency syndrome (AIDS).** *Journal of Immunology* 137:2514-2517, 1986.
- SMITH, P. D., OHURA, K., MASUR, H. **Monocyte function in the acquired immunodeficiency syndrome. Defective chemotaxis.** *J. Clin. Invest.*, New York, 74: 2121-2128, 1984.
- SNOWER, D. P., WEIL, S. C. **Changing etiology of macrocytosis, Zidovudine as a frequent causative factor.** *Am J Clin Pathol*, 99:57-60, 1993.
- SODROSKI, J., GOH, W.C., ROSEN, C., TARTAR, A., PORTELLE, D., BURNEY, A., and Haseltine, W. A. **Replication and cytopathic potential of HTLV-III/LAV with sor genes deletions.** *Science* 231: 1549-1553, 1986.

- SPADA, C., TREITINGER, A., HOSHIKAWA-FUJIMURA, AY. **HIV influence on hematopoiesis at the initial stage of infection.** Eur. J. Haematology, 61: 255-260, 1998.
- SPIVAK, J. L., BENDER, B. S., QUINN, T. C. **Hematologic abnormalities in the acquired immunodeficiency virus infection.** Lancet, London, 339: 909-912, 1992.
- ST CLAIR, M. H., MARTIN, J. L., TUDOR-WILLIAMS, G. **Resistance to ddI and sensitivity to AZT induced by mutation in HIV-1 reverse transcriptase.** Science 253:1557-1559, 1991.
- STASZEWSKI, S., KEISER, P., MONTANER, J., RAFFI, F. et al. **Abacavir-lamivudine-zidovudine vs indinavir-lamivudine-zidovudine in antiretroviral-naive HIV-infected adults: A randomized equivalence trial.** JAMA 285(9): 1155-1163, 2001.
- STEINBROOK, R. **Providing antiretroviral therapy for HIV infection.** The New Engl J of Med 344(11):844-846, 2000.
- STERLING, T. R., VLAHOV, D., ASTEMBORSKI, J., HOOVER, D. R., MARGOLICK, J. B., QUINN, T. C. **Initial plasma HIV-1 RNA levels and progression to AIDS in women and men.** N Engl J Med 344(10): 720-725 2001.
- STITES, D. P., TERR, A. I., PARLOW, T. G. **Imunologia Médica, 9ª ed.** Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p.114-130, 2000.
- STREBEL, K., DAUGHERTY, D., CLOUSE, K., COHEN, D. FOLKS, T., AND MARTIN, M. **The HIV 'A' (sor) gene product is essential for virus infectivity.** Nature (London) 328: 728-730, 1987.
- TAN, C. K., CIVIL, R., MIAN, A. M., So, A. G., DOWNEY, K. M. **Inhibition of the RNase H activity of HIV reverse transcriptase by azidothymidylate.** Biochemistry 30:4831-4835, 1991.
- THOME, M., SCHNEIDER, P., HOFMANN, K., et al. **Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced death receptors.** Nature 386:517-521, 1997.
- TOMASI, T. B., GREY, H. M. **Structure and function of immunoglobulin A.** Prog. Aller. 16:81-85, 1982.
- TREACY, M et al. **Peripheral blood and bone marrow abnormalities in patients with HIV related disease.** Br. J. Haematol., 65: 289-293, 1987.
- TSEUKAS, C. M. **Markers predicting progression of human immunodeficiency virus-related disease.** Clin Micro Rev 1:14, 1994.
- VANDER WERF, M. J., VAN BENTHEN, B. H., VAN AMEIJDEN, E. J. **Prevalence, incidence and risk factors of anemia in HIV-positive and HIV-negative drug users.** Addction 95:383-392, 2000.

- VAUX, D. L., Strasser, A. **The molecular biology of apoptosis**. Proc Natl Acad Sci USA 93:2239-2244, 1996.
- VERONESE, P. D. M., COPELAND, T. D. OROZLAN, S., GALLO, R.C., AND SARNGADHARAN, M. G. **Biochemical and immunological analysis of immunodeficiency virus gag gene products p17 and p24**. J Virol. 62:795-801, 1988.
- WALKER, C. M., MOODY, D. J., STITES, D. P., LEVY, J. A. **CD8+ lymphocytes can control HIV infection in vitro by suppressing virus replication**. Science 234:1563-1566, 1986.
- WALSH, C., KRIGEL, R. LENNETTE, E. KARPATKIN, S. **Thrombocytopenia in homosexual patients: Prognosis, response to therapy and prevalence of antibody to the retrovirus associated with the acquired immunodeficiency syndrome**. Ann. Intern. Med., Philadelphia, 103: 542-547, 1985.
- WANG, S. D., HUANG, K. J., Lin, Y. S. **Sepsis-induced apoptosis of the thymocytes in mice**. Journal Immunology 152:5014-5021, 1994.
- WEI, X., GHOSH, S. K., TAYLOR, M. E. ET AL. **Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection**. Nature 373(6510):p. 117-22, 1995.
- WEISS, G. , FUCHS, D., HAUSEN, A., REIBNEGGER, G., WERNER, E. R., WERNER-FELMAYER, G., WATCHER, H. **Iron modulates interferon-gamma effects in human myelomonocytic cell line THP-1**. Exp Hematol 20:605-610, 1992.
- WEISS, R. A. **How does HIV cause AIDS?** Science 260:1273-1279, 1993.
- WESTBY, M., MARRIOTT, J. B., GUCKIAN, M., COOKSON , S., HAY, P., DALGLEISH, A. G. **Abnormal intracellular IL-2 and interferon-gamma (IFN-[gamma]) production as HIV-1 –associated markers of immune dysfunction**. Clinical and Experimental Immunology 11(2):257-263, 1998.
- WOLTERS, K. C., SCHUITEMAKER, H. MIEDEMA, F. **Rapid CD4+ T-cell turnover in HIV-1 infection: a paradigm revisited**. Immunology Today. 19 (1):167-169, 1998.
- World Health Organization. **Aids images of the epidemic**. Geneva, 1994.
- YARCHOAN, R., MITSUYA, H., MYERS, C. E., BRODER, S. **Clinical pharmacology of 3'-azido-2',3'- dideoxythymidine (zidovudine) and related dideoxynucleosides**. N Engl J Med 321:726-738, 1989.
- YARCHOAN, R., MITSUYA, H., THOMAS, R. V., PLUDA, T. J., HARTMAN, N. R., PERNO, C. F., MARCZYK, E. P. A., JOHNS, D. G., BRODER, S. **In vivo activity against HIV and favorable toxicity profile of 2',3'- dideoxyinosine**. Science 245:412-415, 1989.

**YARCHOAN, R., PERNO, C. F., THOMAS, R. V. Phase I studies of 2'3'-dideoxycytidine in severe human immunodeficiency virus infections as a single agent and alternating with zidovudine (AZT). Lancet 1:76-81, 1988.**

**ZIMMERMAN T. P., MAHONY, W. B., PRUS, K. L. Azido-3'-doxythymidine: an unusual nucleoside analogue that permeates the membrane of human erythrocytes and lymphocytes by nonfacilitated diffusion. J Biol Chem 262:5748-5754, 1987.**

**ZON, L. I., ARKIN, C., GROOPMAN, J. E. Haematologic manifestations of the human immunodeficiency virus (HIV). Semin. Hematol, 25: 208-212 1988.**

---

## 7. ANEXOS

- 1 - Enumeração dos Linfócitos CD4, nos pacientes estudados, de acordo com o tempo de estudo
- 2 - Enumeração dos Linfócitos CD8, nos pacientes estudados, de acordo com o tempo de estudo
- 3 - Determinação da Carga Viral (CV), nos pacientes estudados, de acordo com o tempo de estudo
- 4 - Enumeração das células viáveis, nos pacientes estudados, de acordo com o tempo de estudo
- 5 - Enumeração das células em apoptose, nos pacientes estudados, de acordo com o tempo de estudo
- 6 - Enumeração as células inviáveis, nos pacientes estudados, de acordo com o tempo de estudo
- 7 - Enumeração de Linfócitos totais nos pacientes estudados, de acordo com o tempo de estudo
- 8 - Enumeração dos Leucócitos Totais, nos pacientes estudados, de acordo com tempo de estudo
- 9 - Determinação do Ferro sérico, nos pacientes estudados, de acordo com o tempo de estudo
- 10 - Determinação da Ferritina, nos pacientes estudados, de acordo com o tempo de estudo

- 
- 11 - Enumeração dos Eritrócitos, nos pacientes estudados, de acordo com o tempo de estudo
  - 12 - Determinação do Hematócrito, nos pacientes estudados, de acordo com o tempo de estudo
  - 13 - Enumeração de Plaquetas, nos pacientes estudados, de acordo com o tempo de estudo
  - 14 - Níveis séricos de IgA, em mg/dl, nos pacientes estudados, de acordo com o tempo de estudo
  - 15 - Níveis séricos de IgG, em mg/dl, nos pacientes estudados, de acordo com o tempo de estudo
  - 16 - Níveis séricos de IgM, em mg/dl, nos pacientes estudados, de acordo com o tempo de estudo
  - 17 - Determinação dos níveis de TNF- $\alpha$  nos pacientes estudados, de acordo com o tempo de estudo
  - 18 - Níveis de Volume Corpuscular Médio, em fl dos eritrócitos sangüíneos, nos pacientes estudados, de acordo com o tempo de estudo
  - 19 - Determinação dos níveis de  $\beta$ 2 Microglobulina nos pacientes estudados, de acordo com o tempo de estudo
  - 20 - Determinação de Hemoglobina, em g/dl, nos pacientes estudados, de acordo com o tempo de estudo

**1 - Enumeração dos Linfócitos CD4, nos pacientes estudados, de acordo com o tempo de estudo.**

Paciente	Tempo (dias)			
	0	60	120	180
139	420	715	728	749
140	123	149	140	190
143	190	284	420	274
144	230	272	291	346
145	291	271	498	762
147	639	793	808	885
149	85	67	64	67
151	298	300	410	394
153	413	388	415	336
156	471	784	517	545

**2 - Enumeração dos Linfócitos CD8, nos pacientes estudados, de acordo com o tempo de estudo.**

Paciente	Tempo (dias)			
	0	60	120	180
139	482	550	1010	891
140	747	392	300	624
143	481	770	1235	679
144	380	444	403	187
145	808	340	707	775
147	1987	1614	1270	1414
149	786	1059	855	889
151	919	613	920	729
153	1688	1305	1316	887
156	1461	1494	718	881

**3 - Determinação da Carga Viral (CV), nos pacientes estudados, de acordo com o tempo de estudo.**

Paciente	Tempo (dias)			
	0	60	120	180
139	110000	5300	780	4300
140	64000	80	840	410
143	190000	6800	80	560
144	75000	12000	370	160
145	48000	1600	80	80
147	110000	2300	850	770
149	50000	28000	24000	18000
151	55000	2500	1400	2000
153	720000	80	120	1100
156	80000	4100	370	4600

**4 - Enumeração das células viáveis, nos pacientes estudados, de acordo com o tempo de estudo.**

Paciente	Tempo (dias)			
	0	60	120	180
139	3,56	38,66	49,47	31,76
140	20,60	49,47	49,48	51,21
143	23,83	49,85	54,43	55,49
144	51,47	47,35	27,24	73,22
145	18,94	21,80	21,68	23,05
147	2,51	16,03	21,69	15,16
149	17,57	7,33	2,85	44,13
151	52,54	30,72	20,50	48,57
153	4,77	38,47	56,05	37,97
156	26,47	11,98	72,66	68,42

**5 - Enumeração das células em apoptose , nos pacientes estudados, de acordo com o tempo de estudo.**

Paciente	Tempo (dias)			
	0	60	120	180
139	86,58	44,58	37,77	54,21
140	59,64	45,60	45,60	44,08
143	68,06	47,04	34,42	36,46
144	42,16	46,82	47,96	22,03
145	73,77	73,71	64,09	74,88
147	73,24	82,69	73,57	82,95
149	68,32	87,05	46,31	46,12
151	38,93	53,25	44,84	48,71
153	81,28	50,00	21,35	47,82
156	72,17	83,11	26,02	28,71

**6 - Enumeração as células inviáveis, nos pacientes estudados, de acordo com o tempo de estudo.**

Paciente	Tempo (dias)			
	0	60	120	180
139	9,86	16,76	12,76	14,03
140	19,76	4,93	4,70	4,71
143	8,11	2,04	9,15	9,11
144	6,37	5,83	24,8	4,75
145	7,29	4,48	14,23	2,07
147	24,25	1,27	4,94	1,99
149	14,11	6,52	50,84	9,75
151	8,53	16,03	34,66	2,72
153	13,95	11,43	22,60	14,21
156	1,36	4,91	1,32	2,87

**7 - Enumeração de Linfócitos totais nos pacientes estudados, de acordo com o tempo de estudo.**

Paciente	Tempo (dias)			
	0	60	120	180
139	33,4	45,7	47,9	50,4
140	30,2	26,3	14,8	30,1
143	12,4	13,2	19,8	13,5
144	16,3	23,1	19,1	28,3
145	35,7	43,7	38,5	45,0
147	35,6	28,6	29,6	41,0
149	19,7	36,4	36,4	29,2
151	28,6	35,1	26,5	26,0
153	51,0	44,1	48,1	40,7
156	38,3	40,5	32,5	46,1

**8 - Enumeração dos Leucócitos Totais, nos pacientes estudados, de acordo com tempo de estudo.**

Paciente	Tempo (dias)			
	0	60	120	180
139	4500	4900	4700	4500
140	4500	4500	5600	3900
143	7800	10100	9000	8500
144	5600	3700	5000	3800
145	4300	4400	3700	4000
147	6600	8900	8100	8200
149	6800	4200	3900	4100
151	5100	3100	5500	4900
153	6000	4900	4600	4000
156	6200	6100	5000	5200

**9 - Determinação do Ferro sérico, nos pacientes estudados, de acordo com o tempo de estudo.**

Paciente	Tempo (dias)			
	0	60	120	180
139	69	65	78	54
140	140	121	61	87
143	83	83	164	122
144	74	104	104	133
145	120	98	69	198
147	128	101	60	56
149	94	95	70	84
151	82	156	80	119
153	47	79	77	67
156	50	71	60	63

**10 - Determinação da Ferritina, nos pacientes estudados, de acordo com o tempo de estudo.**

Paciente	Tempo (dias)			
	0	60	120	180
139	30,3	24,3	23,9	16,5
140	366,0	316,0	248,0	264,0
143	42,5	247,0	89,6	77,3
144	121,0	103,0	92,1	77,6
145	135,0	105,0	95,7	85,5
147	59,6	166,6	57,9	57,7
149	92,0	58,9	48,7	80,4
151	396,0	416,0	226,0	287,0
153	116,0	118,0	98,3	73,3
156	11,0	9,2	10,0	9,6

**11 - Enumeração dos Eritrócitos, nos pacientes estudados, de acordo com o tempo de estudo.**

Paciente	Tempo (dias)			
	0	60	120	180
139	4,14	3,46	3,23	3,64
140	3,52	3,46	3,62	3,49
143	4,50	3,37	3,44	3,82
144	5,02	4,48	4,80	4,32
145	4,51	3,88	4,10	3,63
147	4,51	3,95	3,44	3,26
149	4,37	3,99	4,22	4,04
151	3,65	1,74	2,41	2,79
153	5,18	4,15	4,10	4,10
156	4,61	4,19	4,46	4,44

**13 - Determinação do Hematócrito, nos pacientes estudados, de acordo com o tempo de estudo.**

Paciente	Tempo (dias)			
	0	60	120	180
139	38,2	33,8	33,7	37,8
140	38,2	39,2	41,2	39,9
143	44,7	36,2	40,9	43,7
144	46,7	43,1	44,2	45,5
145	42,9	40,2	40,3	43,2
147	38,6	38,4	36,7	35,1
149	38,9	36,7	38,8	35,5
151	36,4	17,3	32,4	34,5
153	45,0	40,3	40,5	40,5
156	38,7	36,2	37,7	39,9

**14 - Enumeração de Plaquetas, nos pacientes estudados, de acordo com o tempo de estudo.**

Paciente	Tempo (dias)			
	0	60	120	180
139	210	231	237	204
140	220	216	235	228
143	180	486	254	227
144	272	214	250	245
145	181	212	213	188
147	301	312	350	282
149	324	302	357	306
151	195	152	256	237
153	147	259	197	190
156	217	246	239	237

**15 - Níveis séricos de IgA, em mg/dl, nos pacientes estudados, de acordo com o tempo de estudo.**

Paciente	Tempo (dias)			
	0	60	120	180
139	233	206	181	
140	576	432	474	474
143	224	231	228	323
144	193	164	176	218
145	216	191	190	284
147	251	114	130	134
149	983	774	819	993
151	119	111	124	156
153	645	425	429	422
156	209	199	295	225

**16 - Níveis séricos de IgG, em mg/dl, nos pacientes estudados, de acordo com o tempo de estudo.**

Paciente	Tempo (dias)			
	0	60	120	180
139	3.080	2.490	2.460	
140	2.610	1.780	1.900	1.500
143	2.760	1.720	2.060	2.370
144	1.360	981	1.150	1.030
145	3.100	2.340	1.850	1.930
147	2.150	1.470	1.560	2.150
149	1.860	1.430	1.950	1.350
151	2.470	1.182	2.460	1.930
153	1.830	1.340	1.440	971
156	1.610	1.570	1.980	1.850

**17 - Níveis séricos de IgM, em mg/dl, nos pacientes estudados, de acordo com o tempo de estudo.**

Paciente	Tempo (dias)			
	0	60	120	180
139	146	120	114	
140	218	141	160	141
143	298	173	174	252
144	122	87	80	120
145	158	126	101	160
147	269	173	213	350
149	74	55	56	67
151	200	102	105	151
153	163	77	58	72
156	121	134	151	125

**18 - Determinação dos níveis de TNF- $\alpha$  nos pacientes estudados, de acordo com o tempo de estudo.**

Paciente	Tempo (dias)			
	0	60	120	180
139	22.1	12.3	15.6	20.2
140	11.7	4.0	5.7	8.6
143	7.0	<4.0	5.2	7.6
144	<4.0	<4.0	7.6	<4.0
145	9.9	<4.0	5.0	<4.0
147	4.3	<4.0	<4.0	<4.0
149	4.5	5.1	13.0	12.8
151	24.5	<4.0	<4.0	<4.0
153	5.9	6.6	7.1	7.8
156	11.5	9.2	7.1	8.2

**19 - Níveis de Volume Corpuscular Médio, em fl dos eritrócitos sangüíneos, nos pacientes estudados, de acordo com o tempo de estudo.**

Paciente	Tempo (dias)			
	0	60	120	180
139	92.3	97.7	104.3	103.8
140	92.3	113.3	113.8	114.3
143	99.3	107.4	118.9	114.4
144	9.1	96.2	92.1	105.3
145	95.1	103.6	98.3	119
147	85.6	97.2	106.7	107.7
149	88.9	92.0	91.9	87.9
151	99.7	99.4	134.4	123.7
153	86.9	97.1	98.8	98.8
156	83.9	86.4	84.5	88.5

**20 - Determinação dos níveis de  $\beta_2$  Microglobulina nos pacientes estudados, de acordo com o tempo de estudo.**

Paciente	Tempo (dias)			
	0	60	120	180
139	3.034	2.444	3.530	3.132
140	3.001	2.161	2.427	1.968
143	2.796	2.574	2.378	2.608
144	1.911	1.406	2.267	1.431
145	2.776	2.579	2.009	2.197
147	1.976	1.341	1.308	1.225
149	3.108	2.845	3.411	3.200
151	3.302	2.985	2.271	1.890
153	2.837	2.178	2.579	2.124
156	3.305	2.657	2.620	3.018

**21 - Determinação de Hemoglobina, em g/dl, nos pacientes estudados, de acordo com o tempo de estudo.**

Paciente	Tempo (dias)			
	0	60	120	180
139	12,5	11,7	11,4	12,6
140	12,5	12,7	14,7	13,6
143	15,8	12,1	14,0	15,6
144	15,6	15,3	15,5	16,0
145	14,4	13,2	13,9	14,7
147	13,2	12,8	12,7	11,7
149	13,1	12,6	13,1	12,4
151	12,0	6,1	11,4	12,0
153	15,2	13,7	13,7	14,2
156	12,9	12,4	12,9	13,2