

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS DE PACIENTES
INFECTADOS PELO HIV SUBMETIDOS À TERAPIA ANTI-RETROVIRAL
ASSOCIADA À SUPLEMENTAÇÃO COM ALFA-TOCOFEROL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Celso Spada

CLEONICE MARIA MICHELON

FLORIANÓPOLIS
2002

ÍNDICE

1. Introdução	1
1.1 Considerações Gerais	1
1.2 Estrutura do HIV-1	3
1.3 Mecanismos de Infecção pelo HIV-1	5
1.4 Alterações dos Parâmetros Hematológicos na Infecção pelo HIV-1	7
1.4.1 Leucócitos.....	7
1.4.1.1 Granulócitos.....	7
1.4.1.2 Agranulócitos	7
1.4.2 Plaquetas.....	9
1.4.3 Eritrócitos.....	10
1.4.4 Hemoglobina.....	11
1.4.5 Ferritina.....	12
1.4.6 Ferro Sérico	12
1.4.7 Transferrina.....	13
1.5 Apoptose.....	13
1.6 O Estresse Oxidativo na Infecção pelo HIV	15
1.7 Alfa-Tocoferol.....	16
2. Objetivos	18
2.1 Objetivo Geral.....	18
2.2 Objetivos Específicos.....	18
3. Material e Métodos	19
3.1 Casuística	19
3.2 Coleta de Sangue	20
3.3 Fracionamento do Sangue.....	20
3.4 Contagem Diferencial de Linfócitos CD ₄ e CD ₈	21
3.5 Viabilidade Celular	21
3.6 Determinação da Carga Viral.....	22
3.7 Hemograma	24
3.8 Níveis Séricos de Haptoglobina.....	24

3.9 Níveis Séricos de Ferritina.....	24
3.10 Níveis Séricos de Ferro Sérico e Transferrina	25
3.11 Soluções de Uso.....	25
3.12 Análise Estatística.....	26
4. Resultados	27
4.1 Contagem de Células CD ₄	27
4.2 Contagem de Células CD ₈	28
4.3 Relação CD ₄ / CD ₈	29
4.4 Viabilidade Celular	30
4.5 Carga Viral.....	33
4.6 Contagem de Leucócitos	34
4.7 Contagem de Linfócitos	35
4.8 Contagem de Plaquetas	36
4.9 Contagem de Eritrócitos	37
4.10 Determinação do Hematócrito	38
4.11 Determinação da Hemoglobina.....	39
4.12 Níveis Séricos da Haptoglobina	40
4.13 Níveis Séricos de Ferritina.....	41
4.14 Determinação do Ferro Sérico.....	42
4.15 Determinação dos Níveis Séricos de Transferrina.....	43
5. Discussão.....	44
6. Conclusões	52
7 Referências Bibliográficas.....	53
8 Anexos.....	69

RESUMO

O vírus da imunodeficiência humana adquirida (HIV) promove uma síndrome infecto-contagiosa de caráter crônico e progressivo, cujo estágio final é a AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida). A evolução da doença é caracterizada pelo comprometimento do sistema imunológico e está associada a desordens sistêmicas incluindo a indução de stress oxidativo. Nos pacientes infectados pelo HIV ocorre um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) com conseqüente diminuição nos níveis plasmáticos de antioxidantes, como o alfa-tocoferol. O objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento dos parâmetros hematológicos de pacientes infectados pelo HIV que fizeram uso de terapia anti-retroviral associada a suplementação com alfa-tocoferol 800 mg/dia. Para realização do estudo foram obtidas amostras de sangue de 22 pacientes soropositivos para o HIV, destes 11 fizeram uso de terapia anti-retroviral mais suplementação com alfa-tocoferol e 11 fizeram uso de terapia anti-retroviral mais placebo. As análises foram realizadas antes do início do tratamento e após 60, 120 e 180 dias. Na análise estatística dos resultados observou-se diminuição significativa da carga viral ($p < 0,002$), em ambos os grupos, possivelmente em decorrência da terapia anti-retroviral e aumento significativo da viabilidade da celular e do número de eritrócitos no grupo suplementado após 180 dias de tratamento, o que permite sugerir que a suplementação com alfa-tocoferol apresenta um efeito positivo na preservação celular, possivelmente devido a sua ação antioxidante, inibindo a ação das EROs e promovendo uma redução dos efeitos tóxicos da Zidovudina sobre a medula óssea, conforme constatado em estudos prévios realizados *in vitro* e em modelos animais. Com esses resultados podemos concluir que o alfa-tocoferol associado a terapia anti-retroviral tende a restabelecer alguns parâmetros hematológicos, contudo para que seus benefícios sejam melhor observados são necessários novos estudos com acompanhamento dos pacientes por período superior a 180 dias.

ABSTRACT

The human immunodeficiency virus (HIV) is related of a chronic and progressive syndrome, with results in AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome). The disease progression is characterized by immune system dysfunction and systemic disorders that involves oxidative stress. In the HIV-infected patients, an increase in the production of reactive oxygen species (ROS) is observed, whit a consequent reduction of plasma levels of antioxidants, such as α -tocopherol. The aim of the present work was to evaluate the behavior of hematological parameters in HIV-infected patients who underwent antiretroviral therapy associated with 800 mg/day α -tocopherol supplementation. Blood samples were collected from 22 HIV-seropositive patients, 11 are submitted to antiretroviral therapy associated whit α - tocopherol supplementation and 11 are submitted to antiretroviral therapy associated whit placebo. The analyses are realized before treatment and 60, 120 and 180 days after. A significant decreased viral load is observed in both groups ($p < 0,002$), possibly decurrent of antiretroviral therapy effects. Significant increase in cellular viability and in erythrocytes number in the supplemented group after 180 days of treatment are observed. This suggest an positive effect of α -tocopherol in reducing lipids peroxidation and in decrease of the toxic effects from Zidovudine over the bone marrow, in conformity with earlier studies realized *in vitro* and animals models. With these results we can conclude that antiretroviral therapy in association with α -tocopherol supplementation is effective in recovering some hematological parameters. However, further evaluation with the follow-up of patients for periods longer than 180 days is necessary to better evaluate α -tocopherol benefice in HIV-seropositive patients.

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	<i>Acquired Imune Deficiency Syndrome</i> (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)
AZT	Zidovudina
Bcl-2	Proteínas Celulares Bloqueadoras da Apoptose
CCR₅	Co-Receptor para Linhagem M-Trópica Do Hiv
CD₄	Linfócitos T com Receptores do Tipo Cd ₄
CD₈	Linfócitos T com Receptores do Tipo Cd ₈
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
CO₂	Dióxido de Carbono
CXCR₄	Co-Receptor para Linhagem T-Trópica Do Hiv
dl	Decilitro
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DST	Doença Sexualmente Transmissível
ELISA	<i>Enzime Linked Immunossorbent Assay</i> (Reação imunoenzimática)
env	Gene Codificador do Envelope Viral
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
Fas	Receptor de Morte (CD95)
g	Gramma
gap	Gene Codificador das Proteínas do Core Viral
gp120	Glicoproteína de Superfície do Envelope Viral
gp41	Glicoproteína Transmembrana
GPx	Glutationa Peroxidase
Grupo M	Grupo Major
Grupo O	Grupo Outhier
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> (Vírus da Imunodeficiência Humana)
HTLV	<i>Human T-Lymphotropic Virus</i>
HU	Hospital Universitário

I - κB	Unidade Inibidora do Fator de Transcrição Nuclear Kappa-B
IFN - γ	Interferon Gama
IL – 1	Interleucina – 1
IL – 2	Interleucina – 2
IL – 4	Interleucina – 4
IL – 6	Interleucina – 6
LAV	<i>Lymphademopathy Associated Virus</i>
LTRs	<i>Long Terminal Repeats</i> (Seqüências de Bases Terminais)
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mm³	Milímetro Cúbico
<i>nef</i>	Fator Regulador Negativo
NF- κB	Fator de Transcrição Nuclear Kappa-B
ng	Nanograma
NK	<i>Natural Killer</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
p17	Proteína 17
p18	Proteína 18
p24	Proteína 24
PBS	Solução Tampão de Fosfato
<i>pol</i>	Gene Codificador da Transcriptase Reversa
<i>rev</i>	Gene Regulador da Expressão de Proteínas Virais
RNA	Ácido Ribonucléico
SOD	Superóxido Dismutase
T₄	Linfócitos T com Receptores do Tipo Cd ₄
<i>tat</i>	Gene Transativador da Transcrição
Tempo 0	Início da suplementação
Tempo 1	60 Dias Após Início Da Suplementação
Tempo 2	120 Dias Após Início Da Suplementação
Tempo 3	180 Dias Após Início Da Suplementação

<i>tev</i>	Gene Ativador do <i>tat</i> e <i>env</i>
TNF – R₁	Receptor 1 do Fator de Necrose Tumoral
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
<i>vif</i>	Gene Responsável pelo Aumento da Infectividade do Vírus
Vit B₁₂	Cianocobalamina
Vitamina A	Retinol
Vitamina C	Ácido Ascórbico
Vitamina E	Alfa-Tocoferol
<i>vpr</i>	Gene Participante da Replicação e Propriedades Citopáticas do Vírus
<i>vpu</i>	Gene Auxiliador da Liberação de Novas Partículas Virais
3TC	Lamivudina
μg	Micrograma

1 – INTRODUÇÃO

1.1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

O vírus da imunodeficiência humana (HIV), promove uma síndrome infecto-contagiosa de curso crônico que é caracterizada por distúrbios clínicos decorrentes do comprometimento do sistema imune celular, conhecida como Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), descrita pela primeira vez em 1981, em homossexuais masculinos nos Estados Unidos da América (Friedland, 1987; Farthing, 1989).

Desde que a AIDS foi caracterizada pelo *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) de Atlanta, Estados Unidos da América (EUA), o número de casos tem aumentado progressivamente no mundo todo. Atualmente, o número de indivíduos infectados pelo HIV está estimado em 40 milhões pela Organização Mundial de Saúde (OMS)(www.aids.gov.br). No Brasil, segundo a Coordenação Nacional de DST/AIDS, do Ministério da Saúde (MS), até setembro de 2001, foram registrados 222.348 casos. Em Santa Catarina até a mesma data foram registrados 9.906 casos, sendo que as cidades de Itajaí, Florianópolis e Balneário Camboriú, encontram-se entre as cidades brasileiras com maior incidência de casos de infecção por HIV (Boletim Epidemiológico AIDS, 2001).

O HIV, provavelmente, teve origem na África Central, onde amostras de soro cujas coletas datam da década de 50 foram positivas para a presença de anticorpos anti-HIV (Friedland, 1987; Farthing, 1989). O HIV-1 foi isolado de pacientes com AIDS em 1983, pelos pesquisadores Luc Montagnier, na França, e Robert Gallo, nos EUA, recebendo o nome de LAV (*Lymphadenopathy Associed*

Virus) e HTLV-III (*Human T-Lymphotropic Virus*) respectivamente, nos dois países. Em 1986, um comitê internacional recomendou o termo HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) para denominá-lo (Coffin, 1986). Nesse mesmo ano foi identificado um segundo agente etiológico com características semelhantes ao HIV-1, denominado HIV-2. Recentemente, foram descritas variantes genômicas tanto do HIV-1 quanto do HIV-2 em pacientes infectados procedentes de diferentes regiões geográficas. Os isolados de HIV-1 foram divididos em três grupos: o grupo M (*major*), que apresenta nove subtipos (A, B, C, D, E, F, G, H e I), o grupo O (*outlier*) que apresenta um subtipo e o grupo não M não O. Em relação ao HIV-2 até o presente foram descritos cinco subtipos (A, B, C, D e E) (www.aids.gov.br).

A infecção pelo HIV ocorre essencialmente através do contato sexual, exposição a agulhas ou seringas contendo sangue contaminado, transfusões de sangue e/ou derivados e transmissão materno-fetal (Roitt, 1996).

O HIV apresenta tropismo por células que expressam receptores CD₄, dentre elas, macrófagos, monócitos, células da glia, células dendríticas, fibroblastos, células de Langerhans e principalmente linfócitos T (Espinozza, 1990; Mellert, 1990; Roitt, 1996).

A evolução da infecção pelo HIV, conforme descrita em trabalhos anteriores é caracterizada por alterações como: depleção do número de linfócitos T₄, aumento do número de partículas virais circulantes, diminuição da viabilidade das células mononucleares, alterações hematológicas e bioquímicas sistêmicas (Grunfeld, 1992; Oliver, 1995; Treitinger, 1995; Spada, 1998).

A infecção produzida pelo HIV pode ser classificada de acordo com as manifestações clínicas apresentadas pela doença ou empregando-se critérios clínicos e laboratoriais. O sistema de estadiamento mais atual foi elaborado pelo CDC em 1993, e está representado no quadro 1 (www.aids.gov.br).

Quadro 1: Classificação da infecção pelo HIV revisada - 1993

Categorias	A	B	C
Nº células CD4	Assintomático Infecção Aguda Linfoadenopatia PG	Sintomático	Condições Definidoras de AIDS
> 500/ml	A1	B1	C1
200-490/ml	A2	B2	C2
<200/ml	A3	B3	C3

No acompanhamento do indivíduo infectado pelo HIV, o momento de iniciar a terapia anti-retroviral é uma das decisões mais importantes. Deve-se considerar que a terapia não é uma emergência e não deve ser iniciada antes que as devidas avaliações clínicas e laboratoriais sejam realizadas, determinando assim o grau de imunodeficiência já existente, o risco de sua progressão e o impacto que a terapia poderá causar ao paciente (www.aids.gov.br).

O objetivo principal da terapia anti-retroviral é retardar a progressão da imunodeficiência e/ou restaurar, tanto quanto possível, a imunidade, aumentando o tempo e a qualidade de vida da pessoa infectada. Para tanto, o Ministério da Saúde recomenda que a terapia inicial seja composta por, pelo menos, dois inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeo, podendo-se associar um inibidor da transcriptase reversa não-análogo de nucleosídeo ou um inibidor da protease viral em situações específicas (www.aids.gov.br).

1.2 - ESTRUTURA DO HIV-1

O HIV-1 é um microrganismo pertencente ao gênero *Lentivírus*, da família dos retrovírus, que apresenta duas características particulares que o diferenciam dos demais: *i)* apresenta duas fitas simples de RNA e *ii)* no processo

de replicação produz ácido desoxirribonucléico intermediário que pode incorporar-se ao genoma da célula hospedeira (Fedrizzi, 1992).

O HIV-1 é um vírus esférico, que consiste de uma hélice de ribonucleoproteína com uma cápside icosaédrica envolta por um envelope lipoprotéico, composto por uma bicamada lipídica na qual encontra-se a gp120, e emergem saliências constituídas por uma glicoproteína chamada gp41. O core é constituído por proteínas conhecidas pela denominação de p17, p18 e p24, e contém a enzima transcriptase reversa e as duas fitas de RNA, que carregam as informações genéticas do vírus (Serb, 1994).

As proteínas essenciais para seu ciclo vital, são codificadas por três genes: o *gag* (*antigen group*) que codifica as proteínas do core viral; o *pol* (*polymerase*) que codifica a transcriptase reversa, enzima que promove a transcrição do RNA para DNA; e o *env* (*envelope*) que codifica a glicoproteína de superfície do envelope viral (gp120) e a glicoproteína transmembrana (gp41) (Cullen, 1991).

Além dessas proteínas estruturais, o genoma do HIV codifica outras proteínas chamadas reguladoras, que são produtos dos genes *tat* (transativador da transcrição), *rev* (regulador da expressão de proteínas virais), *nef* (fator regulador negativo), que regulam sua própria expressão e a dos outros genes virais (Cullen, 1991; Fedrizzi, 1992; Roitt, 1996).

Outros genes como: *vpr* (auxilia na replicação e propriedades citopáticas do vírus), *vif* (aumenta a infectividade viral), *vpu* (auxilia na liberação de novas partículas virais) e *tev* (ativa *tat* e *rev*), são importantes para a regulação da expressão gênica, morfogênese e virulência (Cullen, 1991). Ainda são encontradas as LTRs (*long terminal repeats*), que são duas seqüências de bases terminais, importantes no processo de transcrição do genoma viral (Poli, 1993, Roitt, 1996).

1.3 - MECANISMO DE INFECÇÃO PELO HIV-1

As células alvo do HIV-1 no organismo humano são as células que expressam moléculas CD₄, que se constituem em receptores para o vírus (Roitt, 1996). Os receptores CD₄ são proteínas que estão presentes na superfície de diferentes células, principalmente em um subtipo de linfócitos T, conhecidos como linfócitos CD₄ ou T₄ (Roitt, 1996).

A interação do HIV-1 com as células hospedeiras decorre da afinidade da gp120, presente no envelope viral, pela região V1 da molécula CD₄, particularmente envolvendo o aminoácido fenilalanina-43 no domínio CDR2 (Bowman, 1990; Brodsky, 1990, Roitt, 1966). Essa interação induz mudanças conformacionais no vírus que envolvem a criação (ou exposição) de sítios de ligação para os co-receptores, necessários para que o HIV consiga aderir à célula (Dragic, 1997).

A fusão e entrada do HIV-1 na célula alvo, parece depender de vários co-receptores, sendo que os mais conhecidos são o CCR5 e o CXCR4 (Dragic, 1997; Roitt, 1996). As células de memória como macrófagos e células da microglia expressam o CCR5 (Dragic, 1997; Auewarakul, 2001), que atua como receptor para linhagem M-trópica do HIV-1, já o CXCR4 está presente em vários tecidos humanos, principalmente nos pulmões, coração e cérebro, e também está presente nas células T e células B, atua como receptor para linhagens T-trópicas do HIV-1 (Dragic, 1997). O CCR5 é um receptor para as CC-quimiocinas e o CXCR4 é um receptor da família das CXC-quimiocinas, cuja função fisiológica é a indução de quimiotaxia para linfócitos e monócitos e regulação da resposta inflamatória (Dragic, 1997).

Após a interação entre a gp120 com os receptores e co-receptores, ocorre uma mudança estrutural instantânea na gp41, promovendo a fusão do vírus com a membrana celular (Dragic, 1997). Depois da fusão o vírus é internalizado, etapa em que perde o envelope e libera o material nuclear no citoplasma da célula hospedeira, posteriormente as duas fitas de RNA são

transcritas para DNA por ação da transcriptase reversa (Fedrizzi, 1992; Roitt, 1996).

O ciclo de replicação do vírus se inicia quando a célula infectada é ativada por estímulos, que podem ser decorrentes da ação de citocinas como fator alfa de necrose tumoral (TNF- α), interleucina 1 (IL-1), interleucina 2 (IL-2), interleucina 6 (IL-6) (Schereck, 1991; Piette, 1994) e espécies reativas de oxigênio (EROs) (Schereck, 1991; Piette, 1994) que ativam o fator de transcrição nuclear (NF- κ B) (Schereck, 1991) através da fosforilação de sua subunidade inibitória, o I- κ B (Bauerle, 1996). A forma ativa do NF- κ B migra para o núcleo onde liga-se a seqüências específicas nas regiões promotoras dos genes alvo, para que ocorra a transcrição do DNA proviral para o DNA da célula infectada (Thompson, 1995).

A Segunda etapa no ciclo de replicação viral é a produção de novas partículas virais. Simmonds (1990) em estudos de hibridização *in situ*, observou que um número relativamente reduzido de células (10%), contendo o genoma HIV, replicavam ativamente o vírus.

A replicação do HIV-1 nos linfócitos CD₄ induz efeitos citopáticos decorrentes da: *i*) ação direta do vírus (citólise); *ii*) formação de sincícios entre células infectadas com células não infectadas e posterior morte; ou *iii*) ação das partículas virais liberadas que podem revestir os linfócitos infectados e não-infectados, fazendo com que os mesmos sejam reconhecidos como elementos estranhos pelo sistema imunefagocitário (Roitt, 1996).

1.4 – ALTERAÇÕES DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS NA INFECÇÃO PELO HIV-1

1.4.1 – LEUCÓCITOS:

1.4.1.1 – GRANULÓCITOS:

Os granulócitos ou polimorfonucleares são produzidos na medula óssea a partir de células precursoras, por um processo de proliferação e maturação celular. Todas as linhagens, neutrofílica, eosinofílica e basofílica, seguem a seqüência de desenvolvimento: mieloblasto, promielócito, mielócito, metamielócito, bastonete e segmentado (Roitt, 1966).

Os indivíduos HIV positivos assintomáticos comumente apresentam neutropenia (Zon, 1988; Patton, 1999), sendo que em indivíduos com AIDS a contagem absoluta de neutrófilos pode ser inferior a $2.000/\text{mm}^3$ em 55% dos casos (Treacy, 1987), devido ao efeito direto do HIV sobre a medula óssea, presença de anticorpos anti-neutrófilos e ação imunossupressora exercida por medicamentos (Jaresco, 1999). A contagem de eosinófilos não apresenta alterações em pacientes soropositivos assintomáticos, contudo em indivíduos que apresentam infecções oportunistas observa-se aumento desta população celular (Treacy, 1987). Todavia, nenhuma referência é feita quanto ao comportamento dos basófilos nesta infecção.

1.4.1.2 – AGRANULÓCITOS:

Os agranulócitos encontrados no sangue periférico são 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, Roitt, 1966). 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 (Roitt, 1996).

A infecção de monócitos/macrófagos pelo HIV pode produzir alterações como: anormalidades na apresentação de antígenos; diminuição no processo de opsonização de hemácias; diminuição na resposta quimiotática e alterações na produção de citocinas, como aumento na produção de TNF- α (Morrison, 1990, Roitt, 1996).

A contagem absoluta do número de monócitos circulantes encontra-se diminuída em indivíduos infectados pelo HIV em relação a indivíduos saudáveis, devido a uma maior destruição decorrente da infecção destas células (Treacy, 1987).

Os linfócitos, originam-se de células indiferenciadas da medula óssea, passando por poucas fases intermediárias até a célula madura (Lorenzi, 1992; Roitt, 1996). São classificados em três grupos: *i*) Linfócitos B: são produzidos na medula óssea e lá permanecem até alcançar seu primeiro estágio de maturação (Mondelli, 1990; Roitt, 1996). Os linfócitos B são responsáveis pela síntese das imunoglobulinas, geralmente sob o controle da célula reguladora T (Roitt, 1996), *ii*) Linfócitos T: são derivados da *stem cell* da medula óssea, e se desenvolvem principalmente no timo, onde ocorre sua maturação (Abbas, 1994; Roitt, 1996). Estes linfócitos estão envolvidos na mediação da citotoxicidade celular, produção de citocinas, hipersensibilidade do tipo tardia, regulação da produção de anticorpos e de outras células T (Roitt, 1996) e *iii*) *Natural killer*: são linfócitos granulares grandes que atuam como mediadores da lise celular de células tumorais e células infectadas por vírus, quando estimulados liberam citocinas como interferon- γ , TNF- α e fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos. A ativação e proliferação das células NK é influenciada por citocinas produzidas por monócitos e linfócitos T ativados (Souza, 2000; Hulström, 2000).

Em indivíduos soropositivos para o HIV, assintomáticos, é freqüente a contagem de linfócitos T CD₄ (Auxiliar/Indutor) estar diminuída, bem como a

relação de linfócitos T CD₄/CD₈ (Wang, 1993; Roitt, 1996; Blanco, 2001), em contra partida, a contagem de linfócitos T CD₈ (citotóxico) apresenta-se aumentada em resposta a infecção viral (Roitt, 1996). O número de células NK, assim como sua atividade apresentam-se diminuídos nestes pacientes (Hultström, 2000; Souza, 2000).

Em estudos realizados com indivíduos homossexuais soropositivos para o HIV, 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). Spada *et al.* (1998) demonstraram que há uma queda significativa na contagem destas células com a progressão da infecção, devido aos efeitos citopáticos produzidos pelo HIV.

1.4.2 – PLAQUETAS

As plaquetas são resultantes da fragmentação do citoplasma do megacariócito, têm 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 da inflamação e apresentam receptores para imunoglobulina G (Roitt, 1996).

A diminuição no número de plaquetas é uma desordem hematológica comum na infecção pelo HIV e pode ocorrer tanto em pacientes assintomáticos como em pacientes com AIDS (Kowalska, 1999; Mannucci, 2000; Sato, 2000). Essa trombocitopenia é considerada uma complicação de etiologia multifatorial que envolve a destruição por auto-anticorpos, aumento da destruição a nível esplênico e a diminuição na produção de plaquetas (Cole, 1998; Espanõl, 1999; Kravchenko, 1999). A diminuição na produção de plaquetas ocorre provavelmente devido a infecção pelo HIV dos megacariócitos ou de seus precursores (Espanõl, 1999a). Os megacariócitos infectados apresentam anormalidades morfológicas,

incluindo exposição no núcleo, fato que compromete a produção de plaquetas (Espanõl, 1999a).

1.4.3 – ERITRÓCITOS

Os eritrócitos são os elementos celulares sanguíneos que se encontram em maior número. 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).

Os eritrócitos são células anucleadas que apresentam forma de disco bicôncavo sendo que a medida que circulam sofrem alterações na membrana citoplasmática, adquirindo a forma esférica, que é mais rígida fazendo com que, sejam retidos nos sinusóides do baço, onde são fagocitados pelos macrófagos, ou sofram hemólise intravascular. A vida média dos eritrócitos é de 90 a 120 dias (Erslev, 1995).

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

Estudos realizados por *Saif et al.* (2001) demonstraram que indivíduos infectados pelo HIV apresentavam diminuição nos valores de eritropoetina, hormônio responsável pelo estímulo de crescimento nas células precursoras do eritrócito, o que contribui substancialmente para o desenvolvimento de anemia (Monroe, 2000).

Os indivíduos infectados pelo HIV podem apresentar redução na contagem de eritrócitos em consequência da infecção das células do estroma pelo HIV ou em decorrência da liberação de fatores solúveis, proteínas do HIV e citocinas, como o interferon- γ (IFN- γ), que inibem o crescimento das células eritropoiéticas na medula óssea (Fuchs, 1993; Saif, 2001).

O índice de hematócrito, que representa a concentração de eritrócitos em dado volume de sangue não coagulado, pode estar diminuído devido a redução no número de eritrócitos verificada em alguns pacientes. No entanto, o tamanho e forma dos eritrócitos também influenciam na determinação dos valores percentuais do hematócrito. Os indivíduos infectados pelo HIV podem apresentar macrocitose associada ao tratamento com AZT ou a outros fatores como uso de drogas injetáveis, cirrose hepática e abuso de álcool (Genné, 2000), resultando em aumento nos índices de hematócrito.

1.4.4 – HEMOGLOBINA

A hemoglobina é o principal componente dos eritrócitos, sendo responsável pelo transporte do oxigênio para os tecidos. A hemoglobina proveniente da hemólise intravascular é liberada no plasma e liga-se à haptoglobina, formando um complexo que é removido em 10 à 30 minutos pelo sistema monocítico fagocitário (Erslev, 1995).

Em situações nas quais 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 na forma de bilirrubina ou pelas fezes na forma de urobilinogênio (Mccoubrey, 1992).

A infecção pelo HIV promove a diminuição dos níveis de hemoglobina, sendo esta diminuição um processo gradual e contínuo, decorrente da estimulação imunológica crônica que inibe a produção e diferenciação celular (Fuchs 1993; Mocroft, 1999), associado a progressão acelerada para AIDS (Fuchs, 1993). A anemia é uma complicação freqüente no curso da infecção pelo HIV (Fuchs 1993; Moore, 1998; Mocroft, 1999; Monroe, 2000; Saif, 2001) e sua

patogenia é multifatorial, incluindo infecções, deficiências nutricionais, alterações no metabolismo do ferro e toxicidade a drogas (Mocroft, 1999; Monroe, 2000). Segundo Spiga *et al.* (1999), o AZT pode inibir a síntese de cadeias beta-globina em até 60%.

1.4.5 – FERRITINA

A ferritina é um complexo formado por hidróxido de ferro e proteína (Lorenzi, 1992), é sintetizada por todas as células do organismo, preferencialmente hepatócitos e macrófagos (Emerit, 2001) e se constitui na principal forma de armazenamento de ferro (Lorenzi, 1992). O ferro fica armazenado nos hepatócitos e macrófagos retículoendoteliais do baço e fígado (Emerit, 2001).

Durante a infecção pelo HIV ocorre um aumento nos níveis séricos de ferritina (Ameglio, 1993; Monroe, 2000; Emerit, 2001) em decorrência de uma maior síntese hepática promovida pela ação de citocinas como TNF, IL-1 e IL-6, liberadas por leucócitos ativados (Ameglio, 1993). Esse fato pode contribuir para a formação de EROs, através da liberação dos íons ferro dos locais de depósito por ação do radical superóxido (Fuchs, 1993; Emerit, 2001).

1.4.6 – FERRO SÉRICO

O ferro é um elemento essencial para todas as células vivas tendo papel importante na eritropoiese, síntese de hemoglobina e mioglobina, e na proliferação celular, pois atua como cofator da ribonucleotídeo redutase, enzima responsável pela redução de ribonucleotídeos a desoxirribonucleotídeos, para síntese de DNA (Hollán, 1993). Após a absorção pela mucosa intestinal, na forma de íon ferroso (Fe^{++}), o ferro passa à circulação ligado a uma proteína transportadora denominada transferrina, que o transporta para os eritroblastos da medula óssea ou para outros tecidos, onde é armazenado ligado a ferritina (Emerit, 2001; Erslev, 1995). Em condições fisiológicas são encontrados somente

traços de íons ferro livre nas células, porém em algumas patologias, incluindo todas as doenças infecciosas, ocorre um aumento na liberação de íons ferro que são bioquimicamente danosos, catalisam a conversão de peróxido de hidrogênio e ânion superóxido em espécies reativas que atacam membranas celulares, proteínas e DNA (Emerit, 2001).

Os pacientes soropositivos para o HIV podem apresentar hipoferremia em decorrência do aumento no consumo de ferro pelas células infectadas para síntese de novas partículas virais (Weinberg, 1995) ou devido à má absorção intestinal (Monroe, 2000). No entanto a deficiência de ferro não é um achado comum em adultos portadores do HIV (Monroe, 2000), sendo verificado principalmente em estágios avançados de doença (Fuchs 1993).

1.4.7 – TRANSFERRINA

A transferrina é uma glicoproteína sintetizada pelos hepatócitos e pelas células do sistema monócito/macrófago, sendo a principal proteína carreadora de ferro (Mc Pherson, 1991). A concentração sérica de transferrina é inversamente proporcional aos níveis de ferro (Bauer, 1986).

Em pacientes soropositivos para o HIV a transferrina comporta-se como uma proteína de fase aguda negativa apresentando diminuição dos níveis séricos (Mc Pherson, 1991), em decorrência de uma menor síntese hepática promovida pela ação de citocinas como TNF, IL-1 e IL-6. Essas alterações na biossíntese de proteínas hepáticas são causadas devido a alterações na transcrição dos genes regulados por essas citocinas (ROITT, 1996).

1.5 – APOPTOSE

A apoptose ou morte programada da célula, é o processo natural de morte celular, essencial para o desenvolvimento normal e para manter a homeostasia de todos os organismos multicelulares. É um processo importante

também para remover células debilitadas, infectadas e neoplásicas (Kannan, 2000).

A apoptose é um processo de morte celular distinto da necrose (Kannan, 2000; Romero-Alvira, 1998). Na necrose a integridade da membrana celular é severamente comprometida, promovendo um aumento no tamanho da célula e sua conseqüente lise, já no processo apóptico a membrana celular mantém sua integridade, prevenindo o extravasamento de material celular e a indução de resposta inflamatória (Kannan, 2000).

O processo apóptico geralmente está associado com uma mudança na homeostase do Ca^{2+} intracelular, condensação do citoplasma, desestruturação do citoesqueleto, fragmentação do DNA, ativação de endonucleases e proteases, e fagocitose (Romero-Alvira, 1998).

O desencadeamento do processo de apoptose pode ocorrer *i)* pela ativação dos receptores de morte expressos na membrana celular, como o receptor Fas (CD95) e o receptor-1 do fator de necrose tumoral (TNF-R1), que induzem a ativação da cascata das caspases submetendo a célula à apoptose, ou *ii)* em resposta a estímulos como drogas citotóxicas, radiação e doenças infecciosas, que promovem danos mitocondriais incluindo mudanças no potencial da membrana, aumento na produção de EROs, liberação de citocromo C e conseqüente ativação das caspases resultando em morte celular (Kannan, 2000).

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 que faz parte de uma grande família que contém tanto proteínas pró-apotóticas quanto proteínas anti-apópticas e o segundo inibidor é de origem exógena, genes anti-apoptóticos, produzidos por alguns vírus que mantém a célula viva até o fim do ciclo replicativo (Thomé, 1997).

A principal característica da infecção pelo HIV é o desenvolvimento de imunodeficiência com depleção progressiva de linfócitos CD_4 (Israel, 1997; Banki, 1998). Estudos demonstraram que os linfócitos T de indivíduos infectados pelo HIV

apresentam maior grau de apoptose e uma maior expressão de receptores Fas que os linfócitos de indivíduos não infectados (Israel, 1997).

A ativação de receptores Fas possivelmente é responsável pela depleção dos linfócitos T na infecção pelo HIV. A proteína Tat, a gp120 e citocinas, como o TNF- α , induzem o processo de apoptose mediado pelo receptor Fas em células T (Israel, 1997; Romero-Alvira, 1998; Kanann, 2000).

1.6 – O ESTRESSE OXIDATIVO NA INFECÇÃO PELO HIV

O estresse oxidativo é definido como “um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, em favor dos oxidantes, levando a dano celular” (Kannan, 2000; Polidori, 2001). As EROs geradas no estresse oxidativo podem reagir com macromoléculas biológicas como: lipídios, proteínas, ácidos nucleicos e carboidratos (Chow, 1991; Kannan, 2000).

Na infecção pelo HIV o estresse oxidativo pode ser induzido pela produção excessiva de EROs resultante do aumento na ativação de leucócitos polimorfonucleares ou decorrente do efeito pró-oxidante do TNF- α produzido pelos macrófagos ativados durante o curso da infecção (Allard, 1998; Elbim, 2001). As células infectadas pelo HIV apresentam ainda um aumento endógeno de EROs relacionado ao efeito inibitório exercido pela proteína viral *Tat* sobre a atividade da manganês superóxido dismutase (MnSOD) (Okishima, 1996; Israel, 1997).

A produção excessiva de EROs sem uma adequada compensação antioxidante tem papel importante na patogenia da infecção pelo HIV (Israel, 1997; Elbim, 2001). As EROs ativam o NF- κ B induzindo a transativação do HIV-LTR em monócitos, potencializam a produção de citocinas pró-inflamatórias que podem aumentar a replicação do HIV e desencadear o processo de apoptose em linfócitos T e monócitos (Israel, 1997; Allard, 1998a; Patrick, 2000; Elbim, 2001), constituindo um importante cofator da progressão da doença de infecção assintomática para AIDS (Wang, 1993; Allard, 1998). Contudo, estudos realizados

in vivo e *in vitro* têm demonstrado que a utilização de antioxidantes pode inibir a ativação e replicação viral bem como reduzir significativamente a apoptose em indivíduos infectados pelo HIV (Israel, 1997; Allard, 1998; Romero-Alvira, 1998).

1.7 – ALFA-TOCOFEROL

O alfa-tocoferol é o mais potente e mais abundante antioxidante lipofílico do sistema biológico (Allard, 1998; Brigelius-Flohé, 1999), atua impedindo a propagação das cadeias de radicais livres (Brigelius-Flohé, 1999) protegendo as membranas celulares da peroxidação lipídica (Patrick, 2000). Além da atividade antioxidante o alfa-tocoferol apresenta também propriedades imunoestimuladoras (Wang, 1993; Okishima, 1996; Tang, 1998; Allard, 1998; Brigelius-Flohé, 1999).

Na infecção pelo HIV os benefícios da suplementação com alfa-tocoferol tem sido amplamente estudados em modelos animais e “*in vitro*” (Tang, 1998). Suzuki e Packer (1993) demonstraram que vários derivados da vitamina E inibem a ativação do NF- κ B reduzindo a replicação viral “*in vitro*”. Essa inibição pode ser atribuída a sua capacidade em atravessar o citosol e inibir a produção de EROs na mitocôndria (Patrick, 2000), a inibição da proteína kinase-C (Suzuki, 1993; Wang, 1993) através da atenuação da formação de diglicerol derivado da membrana, lipídio responsável pela translocação e atividade da proteína (Brigelius-Flohé,), e pela capacidade de inibir a ligação do NF- κ B ao DNA da célula (Patrick, 2000).

A suplementação com alfa-tocoferol mostrou ser eficaz também na redução da toxicidade da Zidovudina (AZT) sobre a medula óssea (Wang, 1993; Patrick, 2000).

Estudos prévios demonstraram ainda, que altas doses de alfa-tocoferol reduzem a produção de TNF- α , o número de linfócitos T CD₈, aumentam a relação CD₄/CD₈ e o número de linfócitos totais (Wang, 1993), a síntese de anticorpos, a viabilidade celular, a produção de citocinas, incluindo IL-2 e IL-4,

(Okishima, 1996) e estimulam a atividade das células citotóxicas, das células NK, a fagocitose pelos macrófagos e a resposta mitogênica (Wang, 1993; Monteiro, 2000).

A ação imunoestimuladora do alfa-tocoferol é atribuída a sua capacidade de diminuir a produção de prostaglandina E₂ (PGE₂) pelos macrófagos ativados. A PGE₂ inibe a proliferação de linfócitos e a produção de IL-2 (Meydani, 1990).

O alfa-tocoferol demonstrou, em estudos *in vitro*, ter capacidade de aumentar a viabilidade de linfócitos infectados pelo HIV (Romero-Alvira, 1998). A redução nos níveis de apoptose nessas células promovida pelo alfa-tocoferol provavelmente se deve a sua localização intra-celular, preferencialmente na membrana plasmática, protegendo assim a célula do ataque de EROs (Barroso, 1997)

Portanto, a terapia anti-retroviral associada à suplementação com alfa-tocoferol poderia promover uma melhor qualidade de vida e um aumento na sobrevida dos pacientes infectados pelo HIV-1.

2 OBJETIVOS

2.1 – Objetivo Geral

Avaliar laboratorialmente os efeitos da associação de medicamentos anti-retrovirais e o antioxidante alfa-tocoferol sobre o comportamento dos parâmetros hematológicos de pacientes infectados pelo HIV.

2.2 – Objetivos específicos

Verificar o possível efeito do alfa-tocoferol utilizado em associação com o coquetel anti-retroviral no restabelecimento de parâmetros imunológicos e hematológicos.

Avaliar a capacidade do alfa-tocoferol em restaurar a viabilidade celular dos linfócitos de pacientes HIV positivos submetidos à terapia anti-retroviral.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Casuística:

Participaram do presente estudo 22 voluntários, comprovadamente soropositivos para o HIV-1, testados por dois métodos com princípios diferentes, em conformidade com o protocolo preconizado pelo Ministério da Saúde, com indicação clínica e/ou laboratorial para iniciarem a terapia anti-retroviral segundo as determinações da Coordenadoria Nacional de DST/AIDS. Após terem sido devidamente esclarecidos sobre os objetivos da pesquisa, e de que os resultados seriam tornados públicos, todos os voluntários consentiram em participar da mesma e assim o declararam conforme anexo I. Nenhum dos voluntários, bem como quaisquer dos membros da equipe de pesquisa perceberam quaisquer ganhos financeiros por sua realização. O projeto teve aprovação do Comitê de ética da UFSC conforme protocolo 028/99 (Anexo II)

Dos vinte e dois voluntários sete eram do sexo feminino e 15 do sexo masculino, destes, seis declararam terem sido contaminados através de relação homossexual, onze por relação heterossexual e cinco por compartilhamento de seringas e agulhas para o uso de drogas injetáveis.

Todos os pacientes que participaram deste estudo foram classificados como assintomáticos de acordo com as recomendações do MS. e nenhum fazia uso de qualquer tipo de terapia.

Após terem sido avaliados por médicos do Hospital Nereu Ramos e do Ambulatório de DST/AIDS do Centro 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 (sangue) para posterior análise. Após a coleta os pacientes iniciaram a terapia anti-retroviral e o tratamento com a medicação suplementar constituindo dois grupos:

Grupo controle : Voluntários que receberam terapia anti-retroviral mais placebo;

Grupo de estudo: Voluntários que receberam terapia anti-retroviral mais suplementação de alfa-tocoferol (Novaquímica) 800 mg/dia.

O estudo foi conduzido com perfil duplo cego placebo controlado.

A maioria dos pacientes utilizou terapia anti-retroviral, combinada composta por duas drogas inibidoras da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos mais uma droga inibidora da transcriptase reversa não análogo de nucleosídeo nas seguintes combinações: Zidovudina + Lamivudina + Nevirapina ou Zidovudina + Didanosina + Nevirapina.

3.2 - Coleta de sangue

Os pacientes voluntários pertencentes aos dois grupos fizeram uma coleta antes de iniciar o tratamento e após 60, 120 e 180 dias (tempos 1, 2 e 3). As amostras foram colhidas por venopunção antero-cubital utilizando-se sistema de coleta a vácuo. Foram coletadas amostras de sangue em tubo heparinizado (10 U/ml) para as seguintes determinações: contagem total e diferencial de leucócitos, contagem de eritrócitos, determinação de hematócrito, contagem de plaquetas, contagem de linfócitos CD₄ e CD₈ e quantificação da carga viral. As amostras de sangue para a determinação dos níveis de ferro sérico, ferritina e transferrina foram coletadas em tubo sem anticoagulante. Foi coletada ainda, outra amostra contendo 10 ml de sangue para determinação da viabilidade celular em tubo contendo 3,8 % de citrato de sódio.

3.3 – Fracionamento do Sangue

Para a obtenção do soro e do plasma, o sangue foi centrifugado a 2.500 rpm 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 fossem evitadas eventuais interferências de hemácias nas determinações a serem realizadas.

3.4 – Contagem diferencial de linfócitos CD₄ E CD₈

A contagem diferencial de linfócitos CD₄/CD₈ foi efetuada em amostras de sangue total. Uma fração de 50µl foi tratada com solução lizante para que fosse eliminada uma possível interferência causada pelas hemácias, e marcada com anticorpos monoclonais Becton Dickinson®, após permanecer 60 minutos ao abrigo da luz, foi realizada a identificação e contagem das populações de linfócitos presentes na amostra. A leitura foi realizada em Citômetro de Fluxo Becton Dickinson FACSCounter® no Laboratório de Análises Clínicas do HU/UFSC. Os valores de referência assumidos para a contagem diferencial de linfócitos CD₄/CD₈ foram os seguintes : CD₄ : 500 à 1500/ mm³
CD₈ : 300 à 1000/ mm³

3.5 - Viabilidade Celular

3.5.1 – Isolamento das células mononucleares:

Após coleta em tubo com Citrato de Sódio 3,8% o sangue foi centrifugado por 10 minutos a 2.000 rpm, a película de células brancas formada foi aspirada com pipeta Pasteur e transferida para 5ml de solução tampão de fosfato (PBS) estéril pH 7,4. Esta suspensão foi então homogeneizada suavemente, e, transferida para um tubo contendo 2 ml de Ficoll Paque® (Pharmacia Biotech) com densidade de 1.077 específica para separação de linfócitos, formando assim uma solução bifásica que foi levada à centrifugação por 20 minutos a uma velocidade de 2.000 rpm. Decorrido este tempo, observou-se a formação de uma “nuvem” de linfócitos que foi retirada por aspiração com pipeta Pasteur, sendo então lavada por três vezes em 5 ml de solução PBS estéril pH 7,4. Após o processo de lavagem o botão de células foi ressuspensão em 1 ml de solução PBS estéril pH 7,4 e as células foram contadas em Câmara de Neubauer e ajustadas (1×10^6 células/ml) em meio para cultura RPMI 1640 (Sigma), suplementado com

10% de soro bovino fetal (Gibco), 10 µg/ml de estreptomicina e penicilina 10 UI/ml (Sigma) e 2,5 µg/ml de anfotericina B 50 mg (Eurofarma).

3.5.2 – Estimulação das células mononucleares:

A suspensão de células foi mantida em cultura por 48 horas em estufa com temperatura de 37°C e atmosfera de CO₂ a 5%.

Após a estimulação as células foram ressuspensas e centrifugadas por 5 minutos a 1500 rpm, sendo o seu sobrenadante desprezado. As células foram marcadas com 200 µl de solução de Homodímero de Etídio/Calceína, onde permaneceram por 15 minutos em repouso e na ausência de luz.

A avaliação da viabilidade celular foi realizada em Citômetro de Fluxo Becton Dickinson FACSCALIBUR® no Laboratório Médico Santa Luzia de Florianópolis, onde foram classificadas como viáveis, inviáveis ou apópticas, de acordo com seu tamanho, granulosidade e fluorescência emitida. Os resultados obtidos foram expressos em porcentagem de células por eventos adquiridos.

3.6 – Determinação da carga viral

As determinações foram realizadas utilizando-se sangue total, o qual foi centrifugado a 1500 rpm, por 10 min., para que fosse possível a separação do plasma. O plasma obtido da separação foi então armazenado em solução tampão lizante (Tiocianato de guanidina) para posterior determinação. A amostra é viável por 24 horas se armazenada a 20°C, por sete dias se armazenada à – 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, baseado na tecnologia NASBA, para a determinação quantitativa do RNA do HIV em plasma humano.

O método aplicado consiste em três fases distintas:

3.6.1 - 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 nucleicos 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

3.6.2 - 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 à região *gag* do HIV-1.

3.6.3 - 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-hibridado-sonda” e são capturadas à superfície de um eletrodo por meio de um campo magnético. A voltagem aplicada ao eletrodo desencadeia e reação de eletroquimioluminescência. A luz emitida pelas sondas marcadas com rutênio é proporcional à 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® (Baxtel-Netherlands).

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.

3.7 – 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® (Hungria) no setor de Hematologia do Laboratório de Análises Clínicas do HU/UFSC. A contagem automatizada foi confirmada por leitura diferencial da extensão sangüínea em lâmina corada com May-Grünwald Giemsa, utilizando-se microscópio óptico Olympus CBA (Tokyo-Japão).

3.8 – Haptoglobina

Os níveis séricos de haptoglobina, foram determinados por nefelometria, utilizando-se reagentes específicos para este analito. As determinações foram realizadas em aparelho BN II da Dade Behring (Marburg-Alemanha) no Laboratório de Análises Clínicas HU/UFSC. Os valores de referência assumidos para a haptoglobina são de 35 a 350 mg/dl.

3.9 - Níveis séricos de ferritina

A determinação dos níveis séricos de ferritina, foi realizada por método Imunométrico, utilizando-se aparelho IMMULITE Analyser® (DPC – Los Angeles – EUA), que utiliza marcadores quimiluminescentes específicos para ferritina. As

análises foram realizadas 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.

3.10 – Níveis de ferro sérico e transferrina

A determinação dos níveis de ferro sérico foi realizada em 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 AR Dade Behring® (Marburg-Alemanha), e os valores de referência seguidos para este analito foram :

- Ferro: 35 a 150 µg/dl.
- Transferrina: 160 a 356 mg/dl

3.11 – Soluções de Uso

As soluções utilizadas foram as seguintes:

- Tampão Fosfato (PBS) pH 7,4
- | | |
|--|---------|
| KCl | 200 mg |
| KH ₂ PO ₄ | 200 mg |
| NaCl | 8000 mg |
| Na ₂ HPO ₄ | 1150 mg |
| H ₂ O qsp | 1000 ml |

- Solução de Homodímero de Etídio
Homodímero de Etídio..... 40 μ l
PBS estéril 10 ml

- Solução de Homodímero de Etídio/Calceína
Solução de Homodímero de Etídio..... 2 ml
Calceína1 μ l

3.12 – Análise estatística

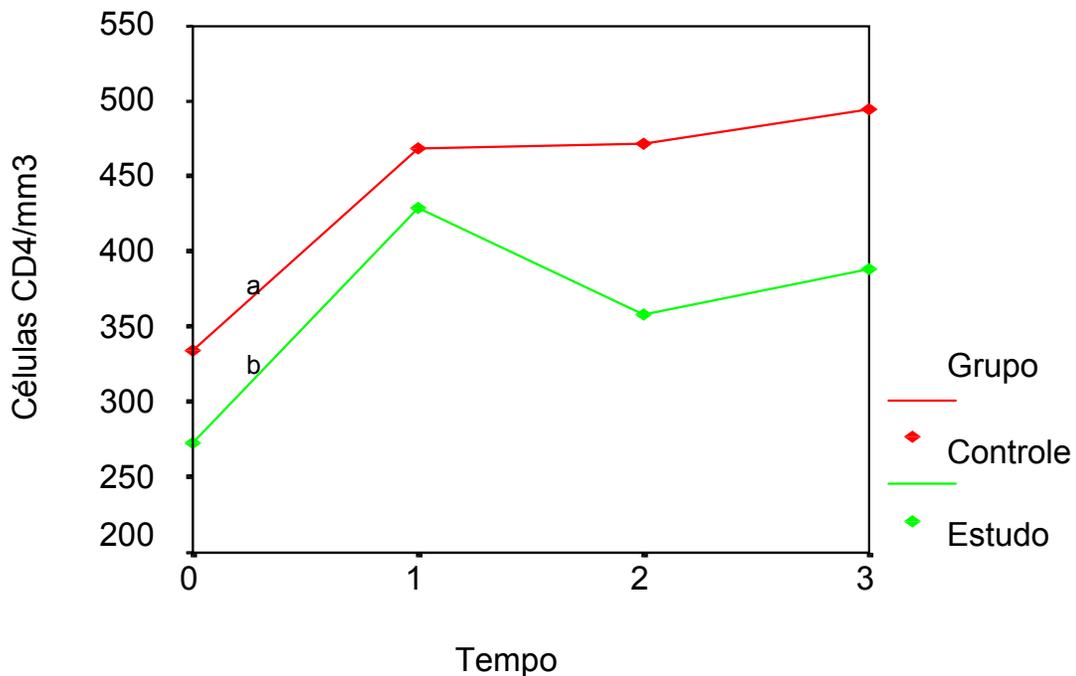
Todas as variáveis estudadas foram comparadas inter e intra-grupos. Na análise inter-grupos o efeito dos tratamentos ao longo do tempo foi avaliado através de Análise Multivariada de Medidas Repetidas, utilizando-se os testes de Pillai's Trace, Wilks' Lambda, Hotelling's Trace e Roy's Largest Root, considerando três hipóteses: efeito do fator tempo, efeito do fator tratamento e interação dos fatores tempo e tratamento, com intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). As análises intra-grupo foram realizadas através dos Contrastes de Diferença com intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

4 – RESULTADOS

4.1 – Contagem de células CD₄

A figura 1 representa os dados referentes a contagem de células CD₄. Observa-se que houve variação significativa ($p < 0,05$) do número de células CD₄, no grupo controle para o tempo “0” em relação aos tempos “1” (60 dias), “2” (120 dias) e “3” (180 dias) e no grupo de estudo para o tempo “0” em relação ao tempo “1”. Entre os grupos que receberam diferentes tratamentos não houve variação significativa ($p > 0,05$).

Figura 1: Número de células CD₄/mm³ dos grupos estudados nos diferentes tempos.



a) $p < 0,05$ em relação aos tempos “1”, “2” e “3”.

b) $p < 0,05$ em relação ao tempo “1”

Efeito do Fator Tempo $p = 0,0022$

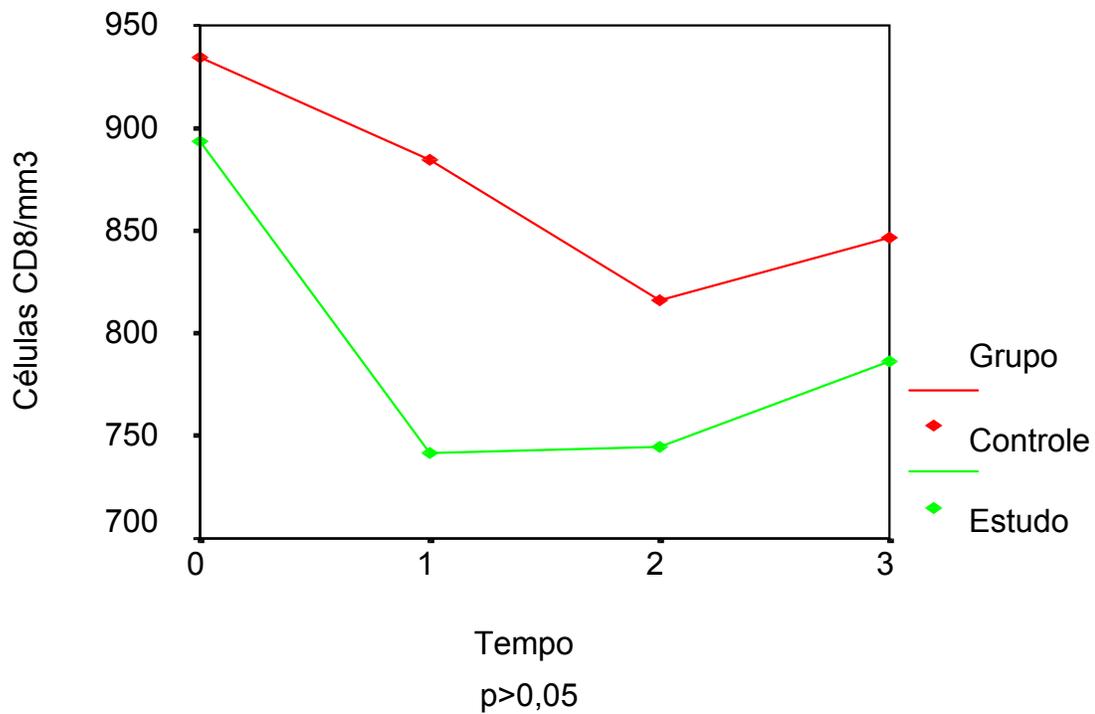
Efeito do Fator Tratamento $p = 0,4345$

Interação dos Fatores Tempo e Tratamento $p = 0,4462$

4.2 – Contagem de células CD₈

Os dados referentes a contagem de células CD₈ são apresentados na figura 2. Não foram observadas variações significativas ($p>0,05$), entre os tratamentos e na comparação realizada intra-grupos nos diferentes tempos.

Figura 2: Número de células CD₈/mm³ dos grupos estudados nos diferentes tempos.



Efeito do Fator Tempo $p= 0,5220$

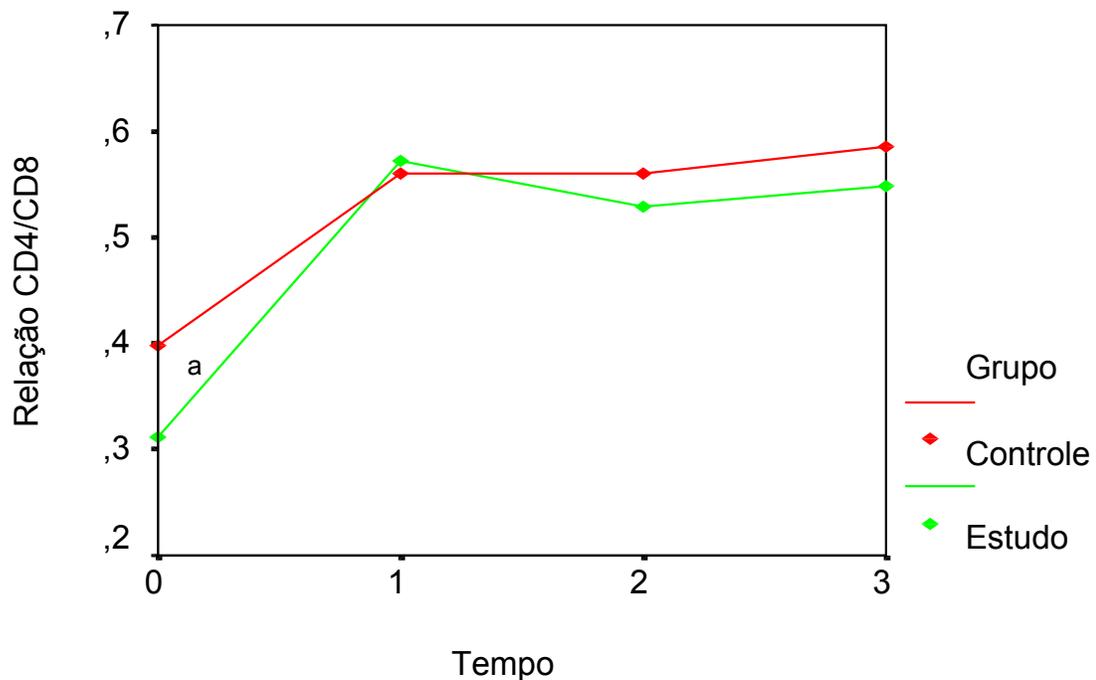
Efeito do Fator Tratamento $p= 0,4430$

Interação dos Fatores Tempo e Tratamento $p= 0,6216$

4.3 – Relação CD₄/CD₈

Na figura 3 estão demonstrados os dados referentes a relação de células CD₄/CD₈. Não foram observadas variações significativas ($p > 0,05$) entre os diferentes tratamentos. Na análise intra-grupo observou-se aumento significativo ($p < 0,05$) após 60 dias de tratamento no grupo suplementado com alfa-tocoferol.

Figura 3 : Relação de células CD₄/CD₈ dos grupos estudados nos diferentes tempos.



a) $p < 0,05$ em relação aos tempos “1”, “2” e “3”.

Efeito do Fator Tempo $p = 0,010$

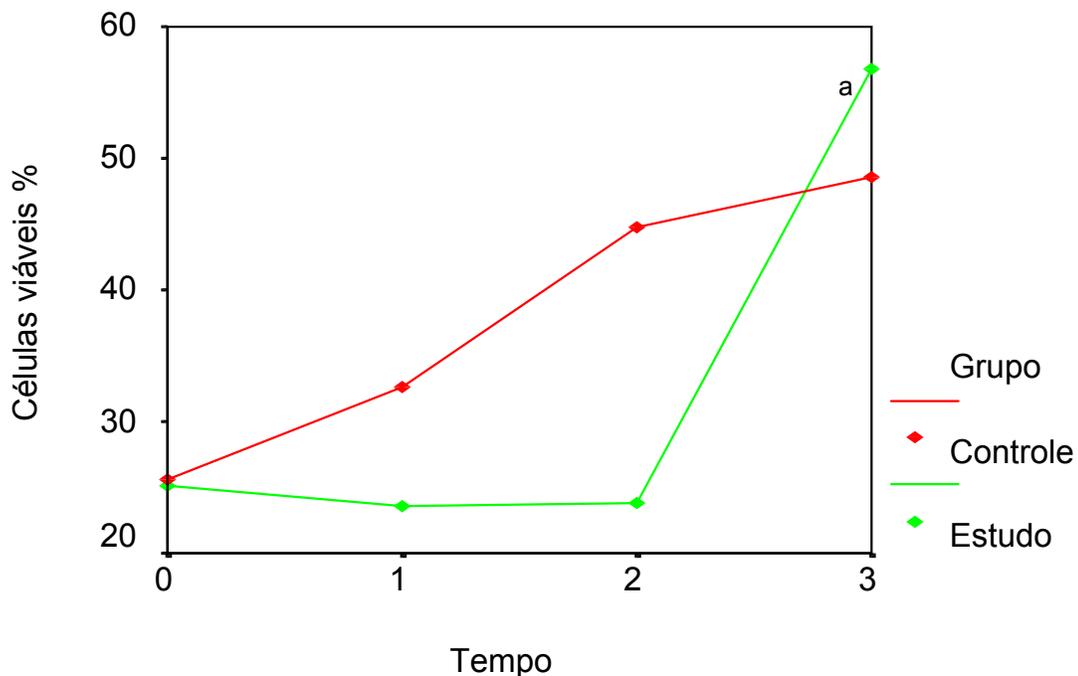
Efeito do Fator Tratamento $p = 0,5826$

Interação dos Fatores Tempo e Tratamento $p = 0,6201$

4.4 – Viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada para três populações celulares distintas: células viáveis, inviáveis e apópticas. Os resultados obtidos estão apresentados nas figuras 4, 5 e 6 respectivamente. De acordo com os dados obtidos, houve diferença significativa entre os diferentes tratamentos para a população de linfócitos em apoptose ($p < 0,008$). Observou-se também diferença estatística significativa nos tempos “0”, “1” e “2” em relação ao tempo “3” ($p < 0,05$) para as células apópticas no grupo de estudo, bem como, para o tempo “3” em relação aos demais tempos nas células viáveis ($p < 0,05$) deste mesmo grupo.

Figura 4: Células viáveis em % dos grupos estudados nos diferentes tempos.



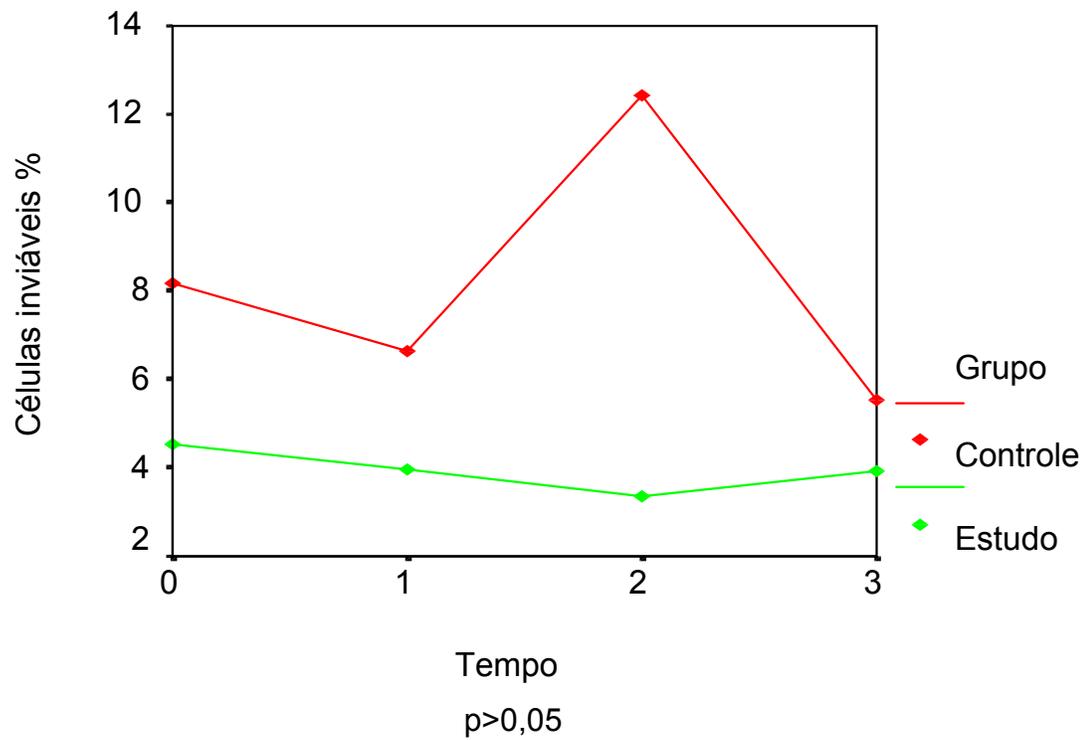
a) $p < 0,05$ em relação aos tempos “0”, “1” e “2”

Efeito do Fator Tempo $p = 0,0002$

Efeito do Fator Tratamento $p = 0,2789$

Interação dos Fatores Tempo e Tratamento $p = 0,2146$

Figura 5: Células inviáveis em % dos grupos estudados nos diferentes tempos.

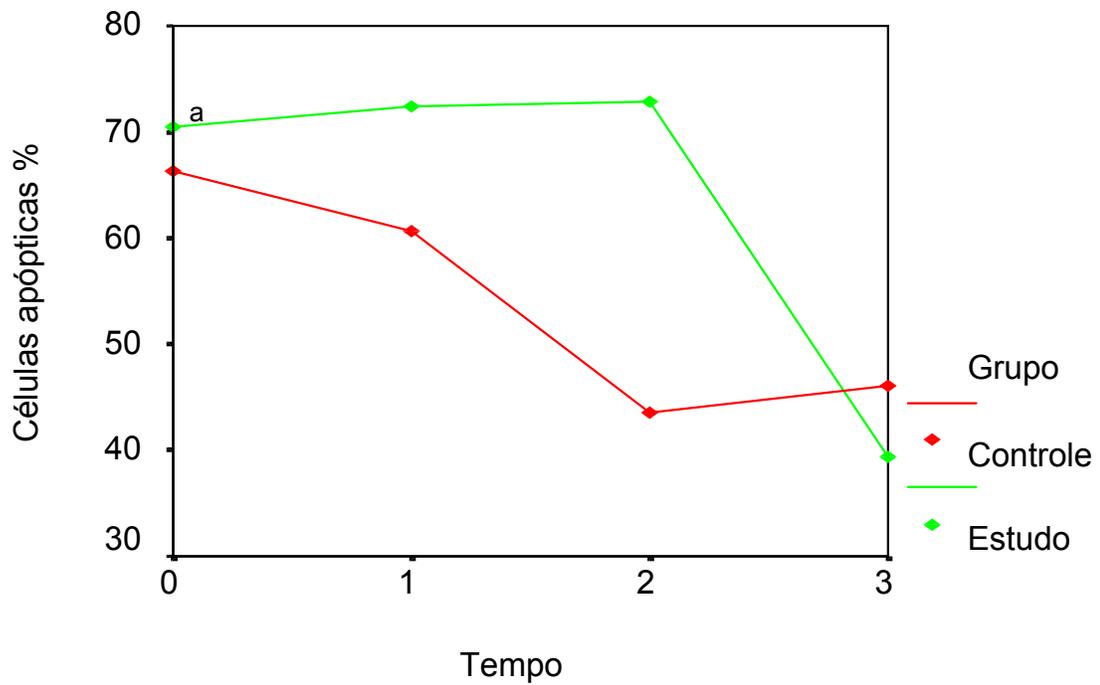


Efeito do Fator Tempo $F = 0,1784$

Efeito do Fator Tratamento $F = 0,1444$

Interação dos Fatores Tempo e Tratamento $F = 0,1699$

Figura 6: Células apópticas em % dos grupos estudados nos diferentes tempos.



a) $p < 0,05$ no tempo "3" em relação aos tempos "0", "1" e "2".

Efeito do Fator Tempo $p = 0,0003$

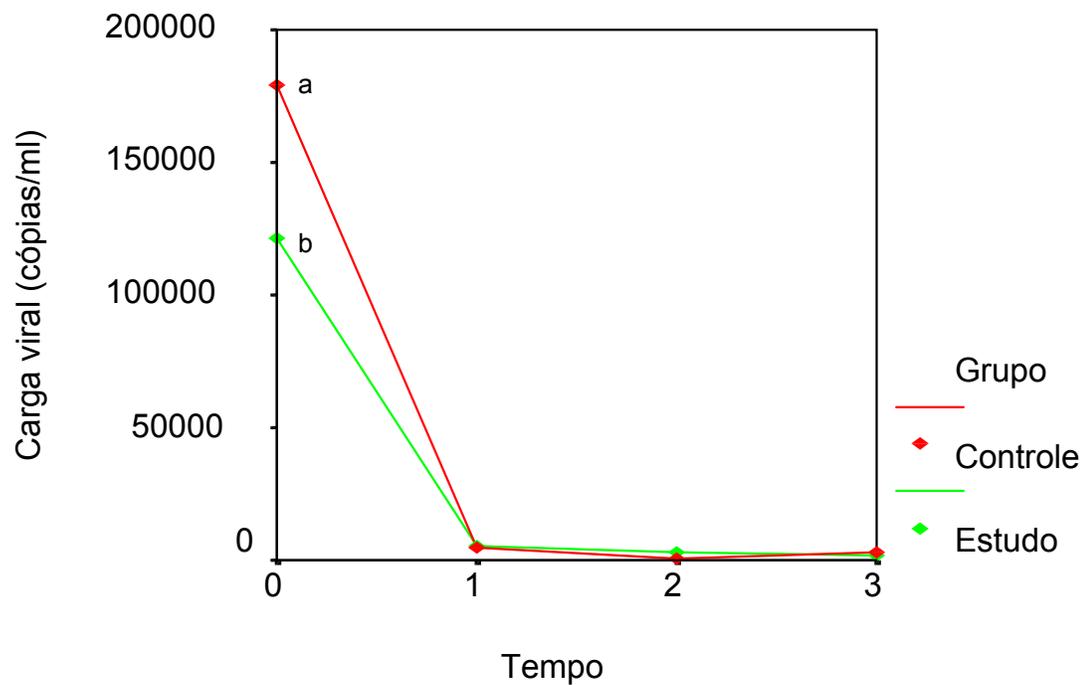
Efeito do Fator Tratamento $p = 0,0080$

Interação dos Fatores Tempo e Tratamento $p = 0,0134$

4.5 – Carga viral

Para a variável carga viral não foram observadas variações significativas ($p > 0,05$) entre os grupos que receberam diferentes tratamentos. Na análise intra-grupos, observou-se redução significativa ($p < 0,05$) com 60, 120 e 180 dias de tratamento nos dois grupos avaliados. Os dados estão representados na figura 7.

Figura 7: Carga viral em cópias/ml dos grupos estudados nos diferentes tempos.



a) $p < 0,05$ em relação aos tempos “1”, “2” e “3”.

b) $p < 0,05$ em relação aos tempos “1”, “2” e “3”.

Efeito do Fator Tempo $p = 0,0003$

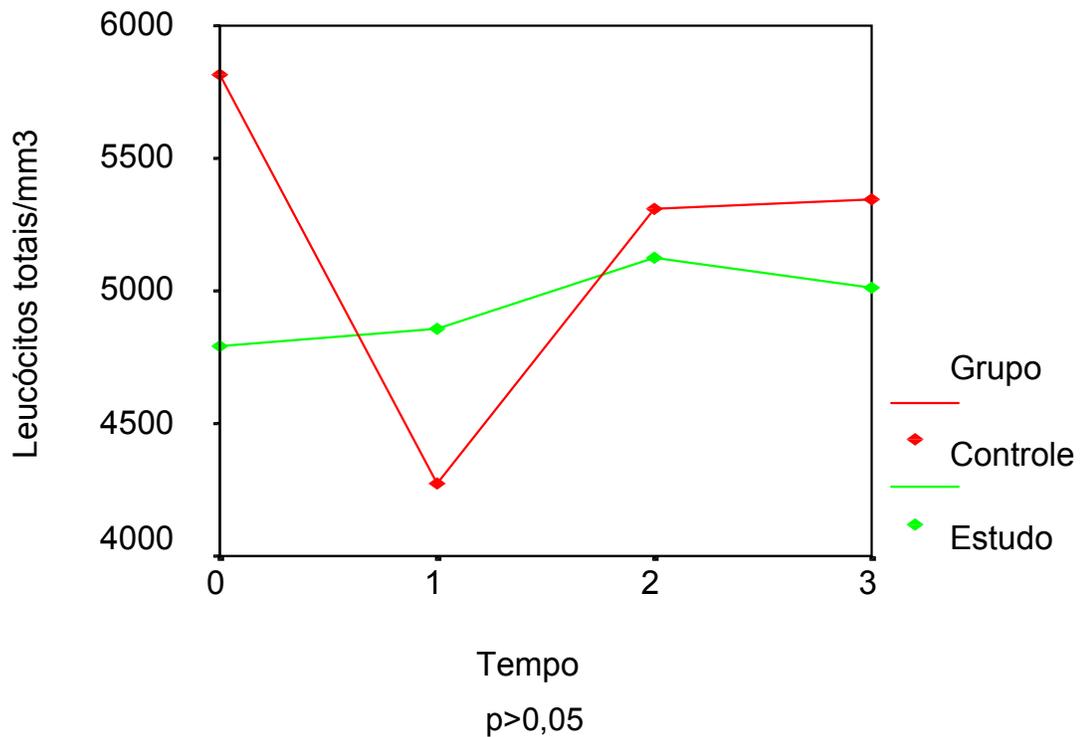
Efeito do Fator Tratamento $p = 0,7100$

Interação dos Fatores Tempo e Tratamento $p = 0,5338$

4.6 – Contagem de leucócitos

O número total de leucócitos dos dois grupos nos diferentes tempos está representado na figura 8. Não houve variação significativa ($p>0,05$) para este parâmetro entre os grupos que utilizaram diferentes tratamentos bem como não foi observada nenhuma variação estatisticamente significativa intra-grupos nos diferentes tempos.

Figura 8: Número total de leucócitos/mm³ dos grupos estudados nos diferentes tempos.



Efeito do Fator Tempo $p = 0,6803$

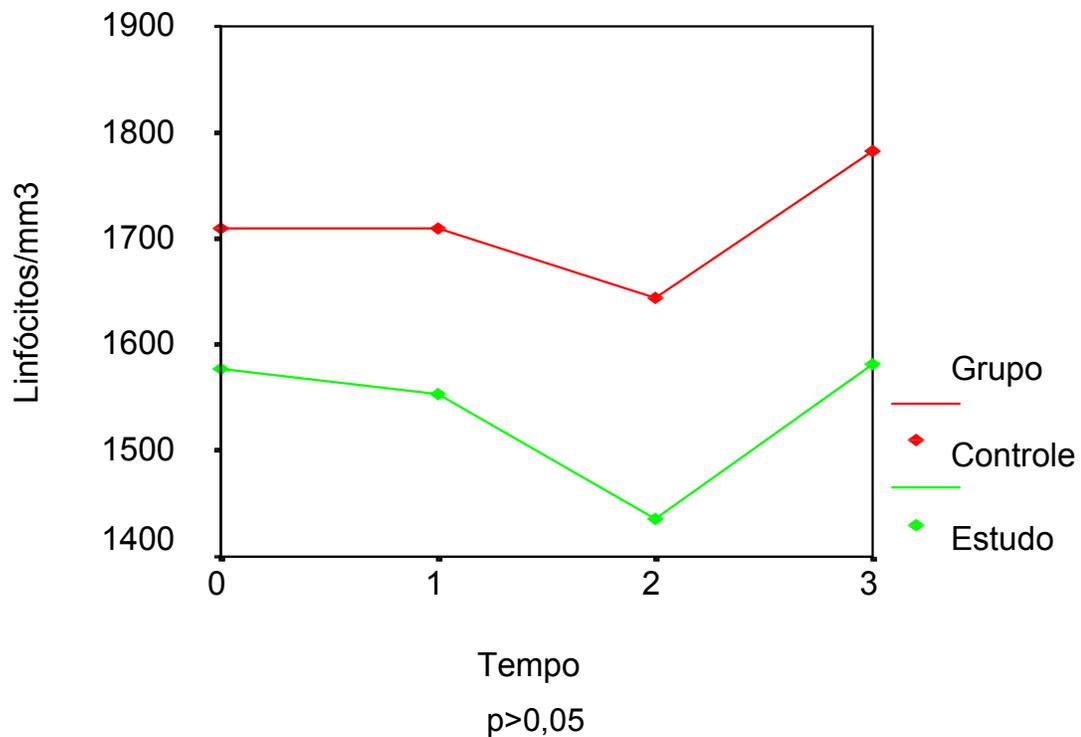
Efeito do Fator Tratamento $p = 0,2769$

Interação dos Fatores Tempo e Tratamento $p = 0,4026$

4.7 – Contagem de linfócitos

Assim como na contagem total de leucócitos, o número de linfócitos não mostrou nenhuma alteração significativa ($p > 0,05$) entre os dois grupos avaliados conforme demonstrado na figura 9. A mesma situação é observada quando a comparação é realizada intra-grupos, não houve em nenhum dos tempos avaliados uma variação significativa ($p > 0,05$) no número de linfócitos no grupo controle ou no grupo suplementado com alfa-tocoferol.

Figura 9: Contagem de linfócitos/mm³ dos grupos estudados nos diferentes tempos.



Efeito do Fator Tempo $p = 0,3720$

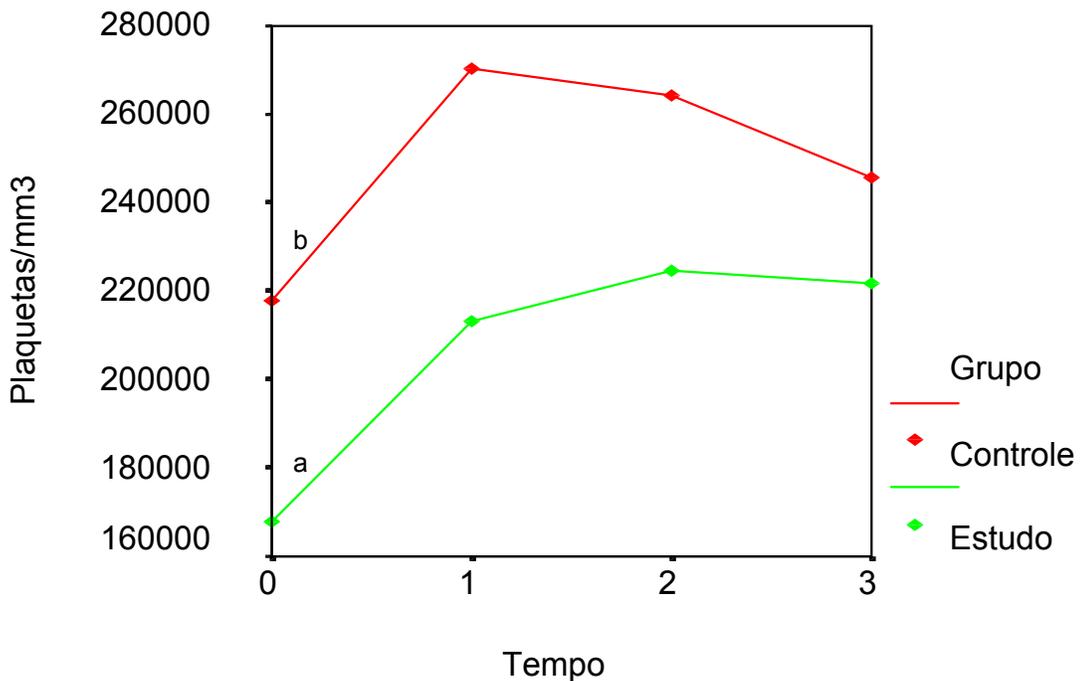
Efeito do Fator Tratamento $p = 0,8846$

Interação dos Fatores Tempo e Tratamento $p = 0,9989$

4.8 – Contagem de Plaquetas

Na figura 10 estão demonstrados os dados referentes a contagem de plaquetas. Não foram observadas variações significativas ($p > 0,05$) entre os diferentes tratamentos nos grupos avaliados. Na análise intra-grupos houve variação significativa no tempo “0” em relação aos demais tempos no grupo de estudo e no tempo “0” em relação ao tempo “1” no grupo controle.

Figura 10: Contagem de plaquetas/mm³ dos grupos estudados nos diferentes tempos.



a) $p < 0,05$ em relação aos demais tempos

b) $p < 0,05$ em relação ao tempo “1”

Efeito do Fator Tempo $p = 0,0026$

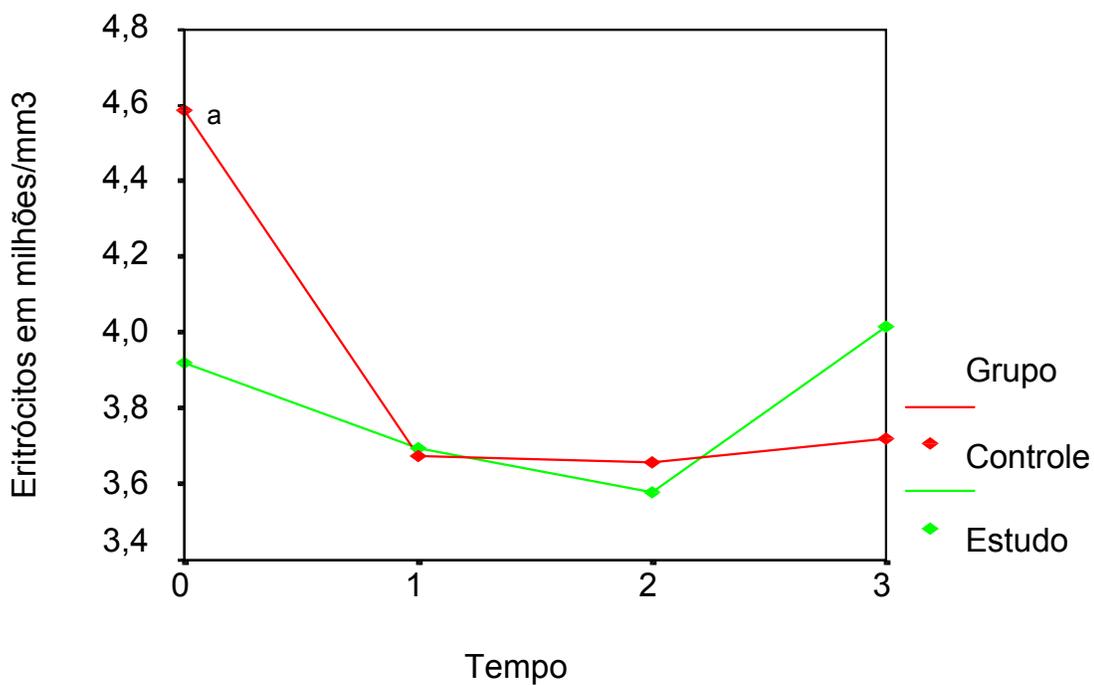
Efeito do Fator Tratamento $p = 0,2036$

Interação dos Fatores Tempo e Tratamento $p = 0,2879$

4.9 Contagem de eritrócitos

Conforme demonstrado na figura 11, foi observada variação estatística significativa na contagem de eritrócitos entre os diferentes tratamentos nos grupos avaliados ($p < 0,0018$). Observou-se também redução significativa do número de eritrócitos ($p < 0,05$) no grupo controle após 60, 120 e 180 dias de tratamento.

Figura 11: Número de eritrócitos em milhões/mm³ dos grupos estudados nos diferentes tempos.



a) $p < 0,05$ em relação aos tempos "1", "2" e "3".

Efeito do Fator Tempo $p = 0,0002$

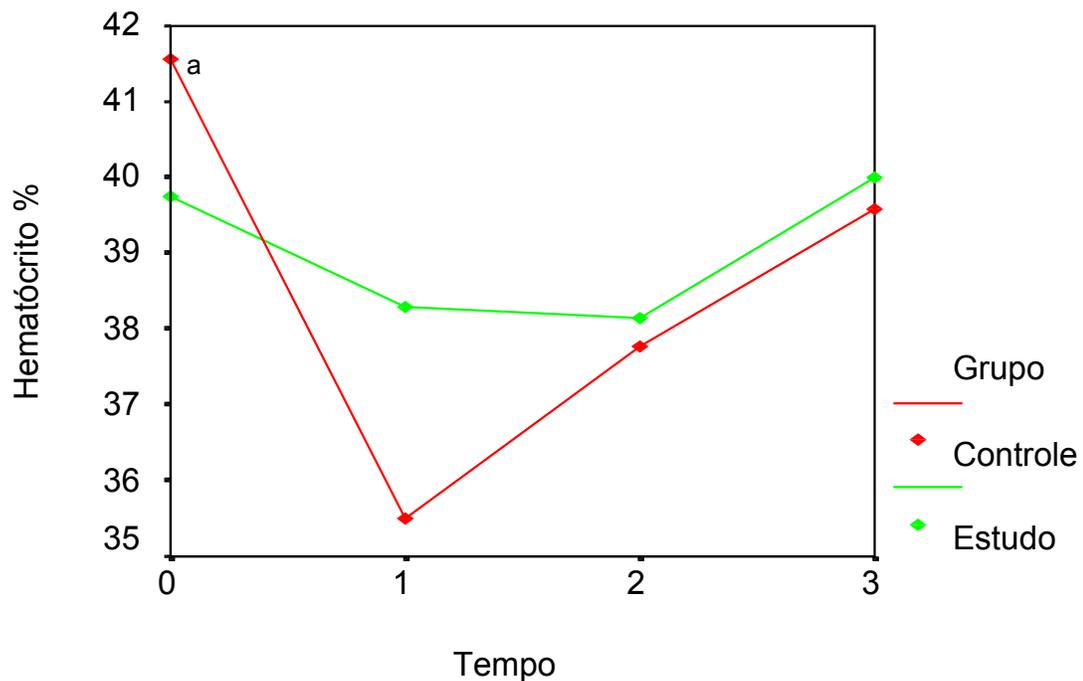
Efeito do Fator Tratamento $p = 0,0018$

Interação dos Fatores Tempo e Tratamento $p = 0,0015$

4.10 – Determinação do hematócrito

Houve variação significativa ($p < 0,05$) no hematócrito na avaliação intra-grupos para o grupo controle no tempo “0” em relação aos tempos “1” e “2”, conforme figura 12. No grupo suplementado não foi observada significância estatística, assim como não houve variação significativa entre os diferentes tratamentos ($p > 0,05$).

Figura 12: Valores de hematócrito em % dos grupos estudados nos diferentes tempos.



a) $p < 0,05$ em relação aos tempos “1” e “2”.

Efeito do Fator Tempo $p = 0,0029$

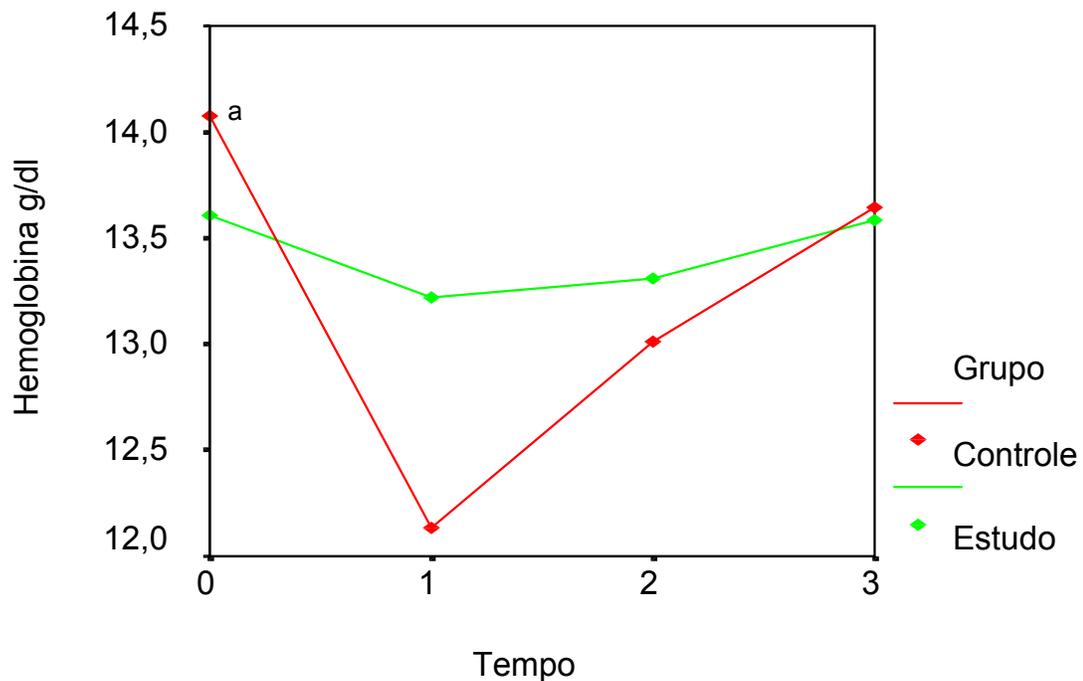
Efeito do Fator Tratamento $p = 0,1452$

Interação dos Fatores Tempo e Tratamento $p = 0,0078$

4.11 – Determinação da hemoglobina

Os dados obtidos na determinação dos níveis de hemoglobina estão demonstrados na figura 13. Não foram observadas variações estatisticamente significativas ($p > 0,05$) entre o grupo controle e o grupo suplementado com alfa-tocoferol. Na análise intra-grupos observou-se diminuição significativa ($p < 0,05$) somente no grupo controle para o tempo “0” em relação ao tempo “1”.

Figura 13: Níveis de hemoglobina em g/dl dos grupos estudados nos diferentes tempos.



a) $p < 0,05$ em relação ao tempo “1”.

Efeito do Fator Tempo $p = 0,0137$

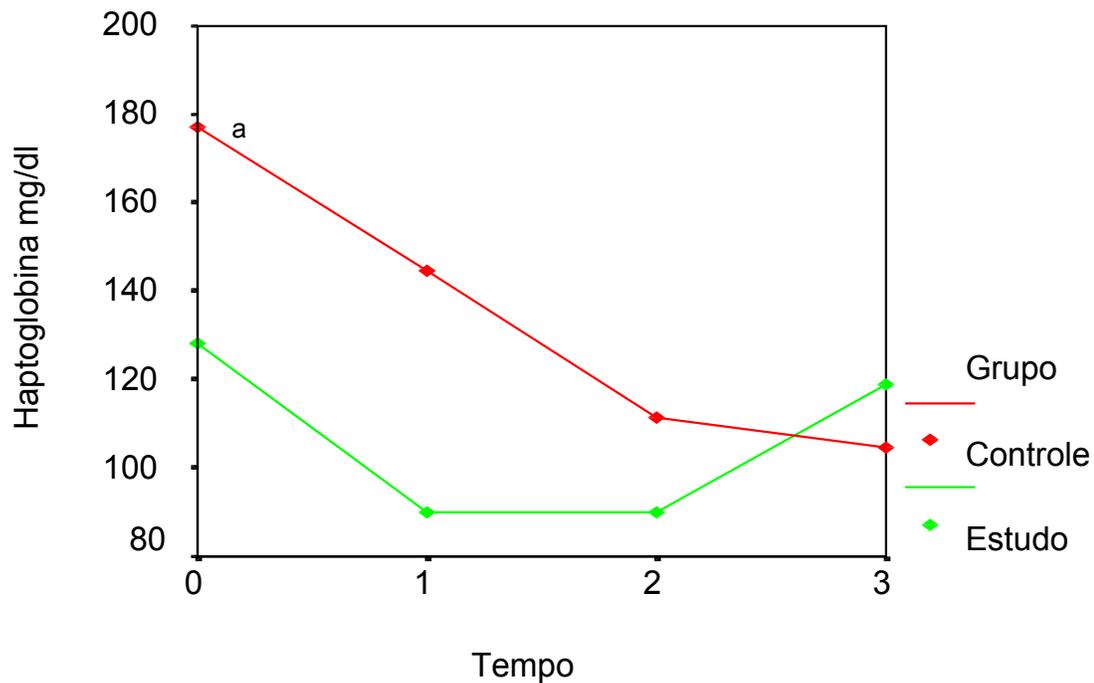
Efeito do Fator Tratamento $p = 0,2984$

Interação dos Fatores Tempo e Tratamento $p = 0,4462$

4.12 – Níveis séricos de haptoglobina

Verificou-se significância estatística ($p < 0,04$) nos níveis séricos de haptoglobina entre os diferentes tratamentos, conforme demonstrado na figura 17. Na análise intra-grupos houve variação significativa ($p < 0,05$) no grupo controle para o tempo “0” em relação aos tempos “2” e “3”. No grupo suplementado não foram observadas variações estatísticas significativas entre os diferentes tempos.

Figura 14: Níveis séricos de haptoglobina em mg/dl dos grupos estudados nos diferentes tempos.



a) $p < 0,05$ em relação aos tempos “2” e “3”.

Efeito do Fator Tempo $p = 0,0124$

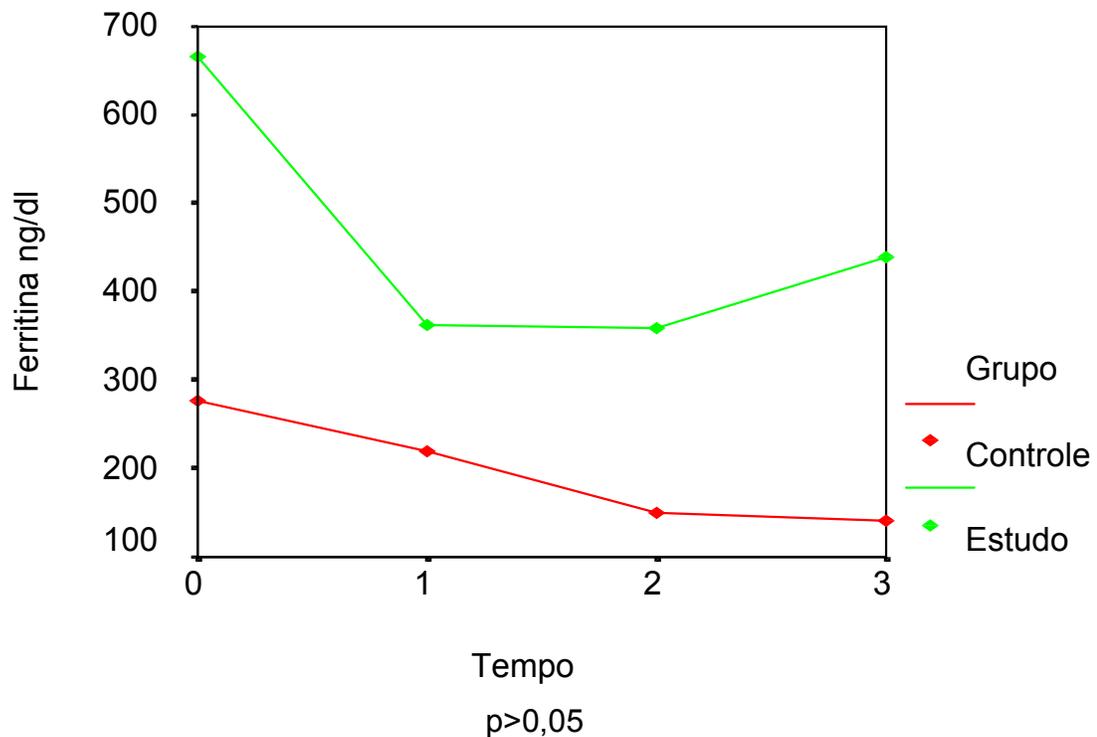
Efeito do Fator Tratamento $p = 0,0534$

Interação dos Fatores Tempo e Tratamento $p = 0,0389$

4.13 – Níveis séricos de ferritina

A figura 14 demonstra o comportamento da ferritina sérica nos grupos estudados. Não foram observadas variações significantes estatisticamente ($p > 0,05$) entre os grupos controle e suplementado e nem intra-grupos nos diferentes tempos.

Figura 15: Níveis séricos de ferritina em ng/dl dos grupos estudados nos diferentes tempos.



Efeito do Fator Tempo $p = 0,4367$

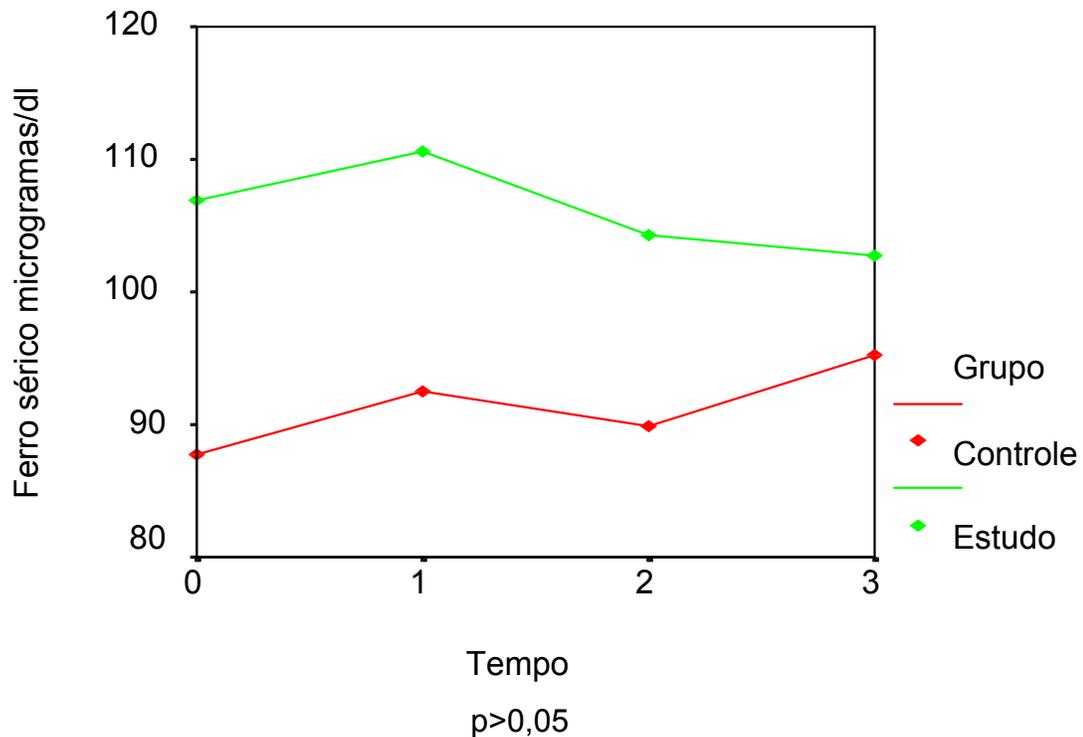
Efeito do Fator Tratamento $p = 0,5451$

Interação dos Fatores Tempo e Tratamento $p = 0,4143$

4.14 – Determinação do ferro sérico

A figura 15 demonstra os resultados obtidos na determinação do ferro sérico. Observa-se com estes resultados, a ausência de variação significativa entre os grupos estudados, bem como, na comparação entre os diferentes tempos em ambos os grupos ($p>0,05$).

Figura 16: Níveis séricos de ferro em $\mu\text{g/dl}$ dos grupos estudados nos diferentes tempos.



Efeito do Fator Tempo $p= 0,8836$

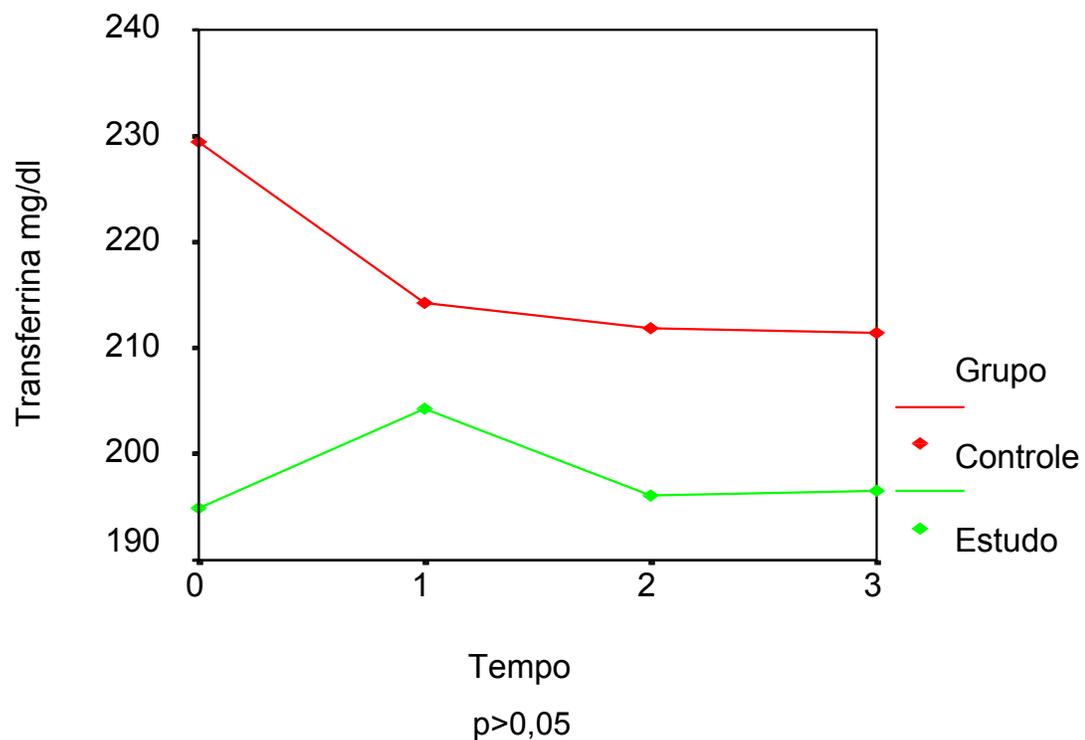
Efeito do Fator Tratamento $p= 0,1705$

Interação dos Fatores Tempo e Tratamento $p= 0,8119$

4.15 – Níveis séricos de transferrina

Os dados obtidos na determinação dos níveis séricos de transferrina não apresentaram nenhuma variação significativa ($p > 0,05$) nos diferentes tratamentos nem ao longo do tempo. Os resultados estão demonstrados na figura 16.

Figura 17: Níveis séricos de transferrina em mg/dl dos grupos estudados nos diferentes tempos.



Efeito do fator tempo $p = 0,9592$

Efeito do Fator Tratamento $p = 0,5676$

Interação dos Fatores Tempo e Tratamento $p = 0,4209$

5 – DISCUSSÃO

A infecção pelo HIV resulta em profundas desordens no sistema imunológico caracterizadas pela diminuição no número de células CD₄ com inversão da relação CD₄/CD₈ (Blanco, 2001). O mecanismo responsável por essa depleção ainda não está totalmente esclarecido (Jaworowski, 1999).

A capacidade do vírus em promover a formação de sincícios entre as células que expressam receptores CD₄, pode ser um dos mecanismos responsáveis pela diminuição dessa população de células (Blanco, 2001; Roitt, 1996). Os efeitos citopáticos promovidos pelo HIV também têm sido apontados como responsáveis pela redução do número de células CD₄ (Roitt, 1996). No entanto, a hipótese mais estudada e aceita é a indução do processo de apoptose (Romero-Alvira, 1998; Moretti, 2000; Blanco, 2001).

O estresse oxidativo, induzido pela infecção pelo HIV, promove um aumento na produção de radicais livres. As EROs geradas podem induzir a replicação viral, através da ativação do NF- κ B (Israel, 1997; Romero-Alvira, 1998; Elbim, 2001), e aumentar a apoptose celular, principalmente via receptores Fas (Israel, 1997; Romero-Alvira, 1998; Moretti, 2000; Elbim, 2001).

Estudos realizados em modelos animais e humanos demonstraram que a suplementação com alfa-tocoferol por via oral restabelece os níveis plasmáticos deste antioxidante, reduzindo o estresse oxidativo, e este aumento está associado a um menor risco de progressão para AIDS (Tang, 1997; Tang, 1998; Allard, 1998).

O alfa-tocoferol apresentou também propriedades imunoestimuladoras que incluem o restabelecimento da proliferação de células T esplênicas, aumento no número de células T maduras e elevação da atividade das células natural killer (Wang, 1994, Okishima, 1996; Patrick, 2000). Redução no número de linfócitos CD₈ e aumento da relação CD₄/CD₈ também foram observados utilizando-se altas doses de alfa-tocoferol (Wang, 1993).

Em nosso estudo, o número de células CD₄ aumentou ao longo do tempo (Figura 1), porém tal comportamento pode ser observado em ambos os grupos, controle e suplementado, possivelmente em resposta a terapia anti-retroviral que reduz o número de partículas infectantes. Segundo Bisset *et al.* (2001) a terapia anti-retroviral traz benefícios na reconstituição da população de células CD₄ em pacientes não sintomáticos.

A relação de células CD₄/CD₈ não apresentou diferença significativa entre os diferentes tratamentos (Figura 3), porém observou-se um aumento mais pronunciado no grupo suplementado, bem como uma redução mais acentuada no número de células CD₈ neste mesmo grupo (Figura 2). Estes achados nos levam a acreditar que a terapia anti-retroviral associada à suplementação com alfa-tocoferol tende a normalizar os parâmetros imunológicos de pacientes infectados pelo HIV.

Estudos prévios constataram que o alfa-tocoferol apresenta atividade na preservação da viabilidade celular, em pacientes HIV-positivos, promovendo uma redução na produção de TNF- α , uma citocina inflamatória produzida por macrófagos ativados que induz a liberação de radicais livres (Wang, 1993; Okishima, 1996; Patrick, 2000).

Na avaliação da viabilidade celular observou-se decréscimo na população de linfócitos em apoptose (Figura 6) e aumento do número de linfócitos viáveis no grupo de estudo após 120 dias de tratamento (Figura 4). A população de linfócitos inviáveis, nesse mesmo grupo, permaneceu estável e em nível inferior ao grupo controle durante o período de 180 dias (Figura 5).

Com esses dados podemos sugerir que a terapia anti-retroviral associada à suplementação com alfa-tocoferol promove um aumento da viabilidade celular em pacientes HIV positivos. Segundo Barroso *et al.* (1997) o alfa-tocoferol protege as células dos danos oxidativos e previne a indução da apoptose independente da presença de Bcl-2.

Suzuki e Packer (1993) demonstraram em experimentos *in vitro* que derivados do alfa-tocoferol tem a capacidade de inibir a ativação do NF- κ B,

essencial à replicação viral, em células incubadas com TNF- α . O efeito inibitório do alfa-tocoferol sobre o NF- κ B pode estar associado a vários eventos como: *i*) a habilidade que alguns de seus isômeros possuem de passar através do citosol e inibir a produção de EROs na mitocôndria (Patrick, 2000), *ii*) a inibição da proteína kinase C, responsável pela fosforilação do I κ -B (Suzuki, 1993; Wang, 1993) e *iii*) a capacidade de inibir a ligação do NF- κ B ao DNA, resultando em inibição completa do NF- κ B (Patrick, 2000) e conseqüente redução da replicação viral (Allard, 1998).

Estudos demonstraram também que o alfa-tocoferol inibe a produção de fosfolipase A₂, que é um potente indutor da replicação viral em monócitos (Wang, 1993).

Em nosso experimento, ambos os grupos apresentaram diminuição nos níveis de carga viral após 180 dias de tratamento, sendo que essa redução apresentou significância estatística ($p < 0,001$) no tempo “0” em relação aos demais tempos (Figura 7), este fato comprova a eficácia da terapia anti-retroviral em inibir a replicação do vírus. Contudo, não houve diferença entre os diferentes tratamentos.

A suplementação com alfa-tocoferol 800 mg/dia mostrou não ser efetiva na redução ou bloqueio da replicação viral nos pacientes estudados no período de 180 dias (Figura 7). No entanto, deve-se considerar que estudos realizados *in vivo* sofrem influências decorrentes do estado geral do paciente, resposta individual à terapia e adesão ao esquema de tratamento. Outro fato importante a ser considerado é o pequeno número de pacientes voluntários em cada grupo (11), sendo que qualquer alteração mais acentuada apresentada por um destes pacientes reflete de forma bastante significativa no comportamento geral do grupo.

A infecção pelo HIV promove desordens hematológicas que incluem leucopenias, linfopenias, trombocitopenias e anemias (Spada, 1998; Hanne, 1999; Patton, 1999; Saif, 2001). Estas alterações podem ser decorrentes da evolução da infecção, uma vez que alguns autores sugerem que a proteína Vpr, do HIV-1,

promove a ativação de fagócitos mononucleares da medula óssea resultando em fagocitose de células pré-maturas (Kulkosky, 2000) ou induzidas pelo uso do AZT que apresenta atividade mielossupressora, promovendo uma diminuição progressiva na celularidade sangüínea (Falguera, 1995).

Nos pacientes que participaram de nosso estudo a contagem total de leucócitos apresentou-se abaixo do limite de referência ($3.500/\text{mm}^3$) em 6 (seis) pacientes, sendo 3 do grupo controle e 3 do grupo de estudo, contudo, em nenhum dos casos a contagem permaneceu nos mesmos níveis durante todo período de estudo (Anexo III.8). A contagem total de linfócitos apresentou-se abaixo do valor de referência ($1.100/\text{mm}^3$) em 8 (oito) pacientes, sendo que somente um paciente do grupo controle apresentou este comportamento nas 4 avaliações realizadas (Anexo III.9). Esses dados vão de encontro aos obtidos por Hane *et al.* (1999) em estudo realizado com 40 pacientes HIV-positivos assintomáticos, dos quais somente um pequeno percentual apresentou leucopenia (7,5%) e linfocitopenia (20%).

A trombocitopenia é uma desordem hematológica comum na infecção pelo HIV que ocorre em pacientes assintomáticos e com AIDS (Sato, 2000) e resulta de uma combinação de fatores envolvendo o desenvolvimento de anticorpos anti-trombócitos (Kravchenko, 1999), redução da sobrevivência das plaquetas na circulação periférica, aumento da retenção na circulação esplênica (Cole, 1998; Español, 1999a) e produção deficiente secundária à infecção pelo HIV dos megacariócitos e precursores (Cole, 1998; Español, 1999a; Kowalska, 1999; Sato, 2000), devido ao uso de drogas mielossupressoras ou aumento na liberação de citocinas inibitórias induzidas pelo HIV (Cole, 1998; Español, 1999a; Español, 1999).

Em nosso estudo não houve diferença significativa na contagem de plaquetas entre os diferentes tratamentos, sendo que ambos os grupos apresentaram aumento do número de plaquetas em 180 dias (Figura 10). Entretanto, um aumento mais acentuado foi observado após 60 dias do início do tratamento no grupo controle e após 120 dias no grupo de estudo, com posterior

redução. Este comportamento apresentado pelos grupos, possivelmente se deve à ação mielossupressora das drogas anti-retrovirais utilizadas, que em um primeiro momento geram um maior estímulo à maturação dos megacariócitos existentes, com liberação das plaquetas para o sangue periférico, porém com o passar do tempo o número de megacariócitos produzidos diminui e se torna insuficiente para repor os níveis plasmáticos, razão pela qual o número de plaquetas apresenta-se em declínio com 180 dias de tratamento nos dois grupos avaliados.

A diminuição da celularidade sangüínea também é observada na série vermelha, sendo a anemia um achado comum no curso da infecção pelo HIV. Estágios mais avançados da doença estão associados a diminuição nos níveis de hemoglobina, e essa diminuição parece estar associada com uma progressão acelerada para AIDS (Fuchs, 1993; Mocroft, 1999).

A anemia nos pacientes HIV positivos pode ser de origem multifatorial (Mocroft, 1999; Monroe, 2000; Saif, 2000). A própria infecção pelo HIV causa anemia, provavelmente como consequência da infecção das células do estroma (Saif, 2000). A infecção direta de progenitores eritróides não está comprovada, porém, fatores solúveis como proteínas do vírus e citocinas, como o IFN- γ , tem a capacidade de inibir o crescimento de células hematopoiéticas da medula óssea de pacientes infectados pelo HIV (Falguera, 1993; Moore, 1998; Saif, 2000). Não está claro se estes fatores promovem uma mielossupressão direta ou se atuam inibindo a síntese de fatores de crescimento (Saif, 2000).

Os medicamentos utilizados na terapia anti-retroviral também podem levar ao desenvolvimento de anemia, devido à sua toxicidade sobre a medula óssea (Geissler, 1994; Falguera, 1995; Moore, 1998; Majluf-Cruz, 2000; Saif, 2000). Outras teorias para o desenvolvimento de anemia nos pacientes HIV como, formação de anticorpos anti-eritrócitos (Saif, 2000), diminuição dos níveis séricos de vitamina B₁₂ (Monroe, 2000; Saif, 2000), alterações na síntese das cadeias de hemoglobina induzidas pelo HIV (Galácteros, 1993) e diminuição nos

níveis séricos de eritropoetina (Mocroft, 1999; Saif, 2000) também são consideradas.

Nós observamos uma diminuição no número de eritrócitos, após 180 dias, em todos os pacientes do grupo controle (Anexo III.11), enquanto no grupo suplementado houve um aumento na contagem de eritrócitos em 6 (seis) pacientes durante o mesmo período (Figura 11). Os níveis de hemoglobina e hematócrito mantiveram-se mais estáveis no grupo de estudo em relação ao grupo controle (Figuras 13 e 12 respectivamente).

Estes dados nos permitem sugerir que a suplementação com alfa-tocoferol tem um efeito positivo na preservação dos eritrócitos, possivelmente devido à sua ação antioxidante prevenindo a peroxidação lipídica das membranas celulares (Regnault, 1993) e promovendo uma redução dos efeitos tóxicos do AZT sobre a medula óssea conforme constatado em estudos prévios realizados *in vitro* e em modelos animais (Gogu, 1990; Wang, 1993; Geissler, 1994; Patrick, 2000).

Na avaliação do quadro anêmico, a determinação da haptoglobina, considerada uma proteína de fase aguda, torna-se importante em pacientes HIV positivos e com AIDS.

Delanghe *et al.* (1998) e Quaye *et al.* (2000) observaram que de acordo com o fenótipo de haptoglobina, apresentado pelo paciente infectado pelo HIV-1, seu prognóstico era mais ou menos favorável.

Em nosso estudo foi avaliada a dosagem total de haptoglobina, não levando em consideração os diferentes fenótipos (Figura 14).

Os dados obtidos na determinação dos níveis de haptoglobina demonstraram significância estatística ($p < 0,04$) entre os diferentes tratamentos, no entanto os valores permaneceram dentro dos limites de referência nos dois grupos.

O grupo de estudo apresentou níveis séricos de haptoglobina inferiores ao grupo controle nos tempos “0”, “1” e “2” o que ressalta um possível efeito antioxidante exercido pelo alfa-tocoferol sobre a membrana dos eritrócitos. No tempo “3” houve um pequeno aumento nos níveis de haptoglobina, possivelmente

em decorrência de uma maior síntese hepática, considerando-se que na determinação realizada com 180 dias de tratamento o número de eritrócitos apresentava-se aumentado (Figura 11), assim como os índices de hematócrito e hemoglobina, descartando a possibilidade de aumento na destruição de eritrócitos. Convém observar, que a haptoglobina se comporta como uma proteína de fase aguda, sendo portanto, um marcador bastante inespecífico.

As alterações no metabolismo do ferro em pacientes HIV estão bem descritas na literatura (Fuchs, 1993; Monroe, 2000; Emerit, 2001). Segundo Goldin (1993), um maior acúmulo de ferro foi observado em pacientes que fizeram uso de terapia anti-retroviral.

Durante a infecção pelo HIV o aumento dos níveis de ferritina é constantemente observado (Riera, 1994; Monroe, 2000; Emerit, 2001). Elevados níveis séricos de ferritina estão associados à várias infecções e a diminuição da sobrevida em pacientes HIV positivos (Saravino, 1999; Monroe, 2000).

Em estudos prévios foi demonstrado que altos níveis de ferritina estão associados com baixos níveis de hemoglobina e transferrina e diminuição na capacidade de ligação do ferro (Fuchs, 1993).

Velasco et al. (1997) concluíram que os pacientes HIV-positivos apresentam níveis de hemoglobina e ferro sérico significativamente reduzidos e níveis de ferritina significativamente aumentados, e que tais alterações mantêm uma correlação positiva com a redução do número de células CD₄.

Nossos achados não confirmam os estudos anteriormente citados, uma vez que os níveis de ferritina apresentaram-se elevados somente no grupo de estudo (Figura 15), sendo que este grupo apresentou também número de células CD₄ e níveis de transferrina inferiores quando comparado ao grupo controle, contudo, os níveis de ferro sérico e de transferrina permaneceram dentro dos valores de referência em ambos os grupos (Figuras 16 e 17 respectivamente).

Os níveis de ferro sérico e transferrina mantiveram-se normais possivelmente porque nenhum dos pacientes apresentou quadro de diarreia crônica, fato que poderia comprometer tais determinações.

6 – CONCLUSÕES

A administração de 800mg/dia de alfa-tocoferol mostrou ser efetiva no aumento da viabilidade dos linfócitos em pacientes HIV positivos submetidos à terapia anti-retroviral, uma vez que o grupo suplementado apresentou menores índices de células em apoptose e de células inviáveis e um maior número de células viáveis, quando comparado ao grupo controle.

A suplementação com alfa-tocoferol apresentou um efeito positivo na preservação dos eritrócitos, possivelmente devido a sua ação antioxidante, prevenindo a peroxidação lipídica das membranas celulares.

A suplementação com alfa-tocoferol sugere uma redução dos efeitos tóxicos promovidos pelo uso da terapia anti-retroviral sobre a medula óssea.

Para que os benefícios da suplementação com alfa-tocoferol associada a terapia anti-retroviral sejam melhor observados sugerimos a realização de novos estudos com acompanhamento dos pacientes por período superior a 180 dias.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H., POBER, J. S. Cellular and molecular immunology. 2^o ed. Philadelphia: W. B. Saunders, p. 1-30, 1994.
- ALLARD, J. P., AGHDASSI, E., CHAU, J., TAM, C., KOVACS, C. M., SALIT, I. E., WALMSLEY, S. L. Effects of vitamin E and C supplementation on oxidative stress and viral load in HIV-infected subjects. **AIDS**, v. 12(13), p. 1653-9, 1998.
- ALLARD, J. P., AGHDASSI, E., CHAU, J., SALIT, I., WALMSLEY, S. Oxidative stress and plasma antioxidant micronutrients in humans with HIV infection. **Am J Clin Nutr**, v. 67, p. 143-147, 1998a.
- AMEGLIO, F., TILOCCA, F., ARCA, M. V., ALEMMANO, L., DOLEI, A. Ferritin downregulation in HIV-Infected cells. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, New York, v. 9, p. 795-798, 1993.
- AUEWARAKUL, P., SANGSIRIWUT, K., SUWANAGOOOL, S., WASI, C. Target cell populations of human immunodeficiency virus type 1 in peripheral blood lymphocytes with different chemokine receptors at various stages of disease progression. **Journal of Virology**, v. 75(14), p. 6384-91, 2001.
- BANKI, K., HUTTER, E., GONCHOROFF, N. J., PERL, A. Molecular ordering in HIV-induced apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273(19), p. 11944-53, 1998.
- BARROSO, M. P., GÓMEZ-DÍAZ, C., LÓPEZ-LLUCH, G., MALAGÓN, M. M., CRANE, F. L., NAVAS, P. Ascorbate and α -tocopherol prevent apoptosis induced by serum removal independent of Bcl-2. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 343(2), p. 243-8, 1997.

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

BAUERLE P. A., BALTIMORE, D. NF κ B: ten years after. **Cell**, v.84, p. 853-862, 1996
BLANCO, J., BARRETINA, J., CABRERA, C., GUTIÉRREZ, A., CLOTET, B., ESTÉ, J. A. CD4 and CD8 T cell death during human immunodeficiency virus infection *in vitro*. **Virology**, v. 285, p. 356-65, 2001.

BISSET, L., CONE, R. W., FISCHER, M., BATTEGAY, M., VERNAZZA, P. L., DUBS, R. W., WEBER, R., GROB, P. J., OPRAVIL, M. Long-term evaluation of T-cell subset changes after effective combination antiretroviral therapy during asymptomatic HIV-infection. **J AIDS**, v. 27, p. 266-71, 2001.

BRASIL. Boletim Epidemiológico AIDS, ano XV, nº 1, julho a setembro, 2001.

BOWMAN, M. R., MacFERRIN, K. D., SCHREIBER, S. L., BUKAKOF, S. J. Identification and structural analysis of residues in the V1 region of CD4 involved in interaction-with human immunodeficiency virus envelop glycoprotein gp 120 and class major histocompatibility complex molecules. **Proc Natl Acad Sci**, Washington, v. 87, p. 9052-6, 1990.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R., TRABER, M. G. Vitamin E: function and metabolism. **FASEB J**, v. 13, p. 1145-155, 1999.

BRODSKI, T. M., WARTON, M., MYERS, R. M., LITTMAN, D. R. Analysis of the site of CD4 that binds to the HIV envelop glycoprotein. **J Immunol**, Baltimore, v. 114, p. 3078-86, 1990.

CARPINTER, C. C. J., COOPER, D. A., FISCHER, M. A., GATELL, J. M., GAZZARD, B. G., RAMMER, S. N., et al. Antiretroviral therapy in adults up date recommendations of the international AIDS society-USA panel. **JAMA**, v. 283(3), p. 381-90, 2000.

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

CHOW, C. K. Vitamin E and oxidative stress. **Free Radic. Biol. Med.** v. 11, p. 215-232, 1991.

COLE, J. L., MARZEC, U. M., GUNTHEL, C. J., KARPATKIN, S., WORFORD, L., SUNDELL, I. B., LENNOX, J. L., NICHOL, J. L., HARKER, L. A. Ineffective platelet production in thrombocytopenic human immunodeficiency virus-infected patients. **Blood**, v. 91(9), p. 3239-46, 1998.

CRAWFORD, A. G. L., KURST, B., MULLER, S., RIVIERI, Y., CUILLÉ, M. A. R., BÉCHET, J. M., MONTANGNEIR, L., HOVANESSIAN, A. G. The cytopathic effect of HIV is associated with apoptosis. **Verdogy**, v. 185, p. 829-39, 1991.

CULLEN, B. R. Regulation of HIV-1 gene expression. **FASSEB J**, Bethesda, v. 5, p. 2361-2368, 1991.

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

DELANGHE, J. R., LANGLOIS, M. R., BOELAERT, J. R., VAN ACKER, J., VAN WANZEELE, F., VAN DER GROEN, G., HEMMER, R., VERHOFSTEDÉ, C., DE BUYZERE, M., DE BACQUER, D., ARENDT, V., PLUM, J. Haptoglobin polymorphism, iron metabolism and mortality in HIV infection. **AIDS**, v. 12, p. 1027-1032, 1998.

DRAGIC, T., TRKOLA, A., MOORE, J. P. HIV co-receptors: Gateways to the cell. **HIV**, v.7(3), p. 3-12, 1997.

ELBIM, C., PILLET, S., PREVOST, M. H., PREIRA, A., GIRARD, P. M., ROGINE, N., HAKIM, J., ISRAEL, N., GOUGEROT-POCIDALO, M. A. The role of

phagocytes in HIV-related oxidative stress. **Journal of Clinical Virology**, v. 20, p. 99-109, 2001.

EMERIT, J., BEAUMONT, C., TRIVIN, F. Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. **Biomed Pharmacother**, v. 55, p. 333-9, 2001.

ERSLEV, A. J., BEUTLER, E. Production and destruction of erythrocytes. In: BEUTLER, E. et al. **Williams Hematology**. New York:MacGraw-Hill, Inc. 5th ed. P. 425-40, 1995.

ESPAÑOL, I., HERNÁNDEZ, A., MUÑIZ-DIAZ, E., AYATS, R., PUJOL-MOIX, N. Usefulness of thrombopoietin in the diagnosis of peripheral thrombocytopenias. **Haematologica**, v. 84, p. 608-13, 1999.

ESPANÓL, I., MUÑIZ-DIAZ, E., MARGALL, N., RABELLA, N., SAMBEAT, M. A., HERNÁNDEZ, A., PUJOL-MOIX, N. Serum thrombopoietin levels in thrombocytopenic and non-thrombocytopenic patients with human immunodeficiency virus (HIV-1) infection. **Eur J Haematol**, v. 65(4), p. 245-50, 1999. [ABSTRACT]

ESPINOZA, L. R., AGUILAR, J. L., ESPINOZA, C. G. HIV associated arthropathy: HIV antigen demonstration in the sinovial membrane. **J Rheumatol**, v. 17, p. 1195-201, 1990.

FALGUERA, M., PEREZ-MUR, J., PUIG, T., CAO, G. Study of the role of vitamin B₁₂ and folinic acid supplementation in preventing hematologic toxicity of zidovudine. **Eur J Haematol**, v. 55, p. 97-102, 1995.

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

FEDRIZZI, E. N. AIDS na mulher- I: Aspéctos gerais, epidemiologia e patogenia. **Femina**, p. 614-6, 1992.

FRIEDLAND, G. H., R. S. The transmission of the human immunodeficiency virus. **N. Engl. J. Med.**, v. 317, p. 1125-1135, 1987.

FUCHS, D., ZANGERLE, R., ARTNER-DWORZAK, E., WEISS, G., FRITSCH, P., TILZ, G. P., DIERICH, M. P., WATCHTER, H. Association between immune activation, changes of iron metabolism and anaemia in patients with HIV infection. **Eur J Haematol**, v. 50, p. 90-4, 1993.

GEISLER, R. G., GANSER, A., OTTMANN, O. G., GUTE, P., MORAWETZ, A., GUBA, P., HELM, E. B., HOELZER, D. In vitro improvement of bone marrow-derived hematopoietic colony formation in HIV-positive patients by alpha-D-tocopherol and erythropoetin. **Eur J Haematol**, v. 53(4), p. 201-206, 1994. [ABSTRACT]

GOGU, S. R., RANGAN, S. R., AGRAWAL, K. C. Protection of zidovudine (AZT)-induced bone marrow toxicity and potentiation of anti-HIV activity with vitamin E. **Abstr Annu Meet Am Soc Microbiol**, v. 90, p. 338, 1990. [ABSTRACT]

GRUNFELD, C., FINGOLD, K. R. Role of the cytokines, interferon- α and tumor necrosis factor in the hypertriglyceridemia and wasting of AIDS. **J Nutr**, v. 122, p. 749-53, 1992.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, M. C. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford: Oxford University Press, p. 1-267, 1989.

HANE, A. A., THIAM, D., CISSOKHO, S., KABOU, F., NDIAYE, M., DIOP, S., BA, O., FALL, K., DIOP, B. M., NDIR, M., DIEHIOU, A., TOURÉ-FALL, A. O., DIAKHATE, L. Anomalies de l'hémogramme et immunodépression dans l'association VIH/sida-tuberculose pulmonaire. **Clinique**, 1999.

HOLLÁN, S., JOHANSEN, K. S. Adequate iron stores and the Nil Nocere Principle. **Hematologia**, Budapest, v. 25 (2), p. 69-84, 1993.

HULTSTRÖM, A. L., HEDJEMAN, B., LEANDERSON, A. C., BRATT, G., CARBONE, E., WAHREN, B. Human natural killer cells in asymptomatic human immunodeficiency virus-1 infection. **Intervirology**, v. 43, p. 294-301, 2000.

ISRAEL, N., GOUGEROT-POCIDALO, M. A. Oxidative stress in human immunodeficiency virus infection. **CMLS**, v. 53, p. 864-70, 1997.

JARESCO, G. S. Etiology of neutropenia in HIV-infected patients. *Am J Health Syst Pharm*, v. 56 Suppl 5:S5-8, 1999.

JAWOROWSKI, A., ANTHONY, C., SUZANNE, M. Does HIV cause depletion of CD₄ T cells in vivo by the induction of apoptosis. **Immunology Cell Biology**, v. 77, p. 90-98, 1999.

KANNAN, K., JAIN, S. K. Oxidative stress and apoptosis. **Pathophysiology**, v. 7(27), p. 153-63, 2000.

KOWALSKA, M. A., RATAJCZAK, J., HOXIE, J., BRASS, L. F., GEWIRTZ, A., PONCZ, M., RATAJCZAK, M. Z. Megakaryocyte precursors, megakaryocytes and platelets express the HIV co-receptor CXCR4 on their surface: determination of response to stromal-derived factor-1 by megakaryocytes and platelets. **Br J Haematol**, v. 104(2), p. 220-9, 1999. [ABSTRACT]

KRAVCHENKO, A. V., POLIAKOVA, A. M., KHASBEKOVA, S. G., DONSKOV, S. I., ASTRINA, O. S., MALEEV, V. V. Autoantibodies to the thrombocytes and erythrocytes in HIV-infected patients. **Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol**, v. 1, p. 78-80, 1999. [ABSTRACT]

KULKOSKY, J., BOUHAMDAN, M., GEIST, A., NUNNARI, G., PHINNEY, D. G., POMERANTZ, R. G. Pathogenesis of hiv-1 infection within bone marrow cells. **Leuk Lymphoma**, v. 37 (5-6), p. 497-515, 2000. [ABSTRACT]

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

MAJLUF-CRUZ, A., LUNA-CASTANOS, G., TREVINO-PEREZ, S., SANTOSCOY, M., NIETO-CISNEROS, L. Lamivudine-induced pure red cell aplasia. **Am J Hematol**, v. 65(3), p. 189-91, 2000. [ABSTRACT]

MANNUCCI, P. M., GRINGERI, A. HIV-related thrombocytopenias. **Ann Ital Med Int**, v. 15(1), p. 20-7, 2000. [ABSTRACT]

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, v. 295, p. 13-18, 1992.

MELLERT, W., FESTL, H., ELMER, S., KLEINSCHMIDT, A. , SCHMIDT, J., ROTH, W.K., ERFLE.V., Infection of human fibroblasts and osteoblast-like cells with HIV-1. **AIDS**, v. 4, p. 527-35, 1990.

MERLUZZI, V. J., HARGRAVE, K. D., LABADIA, M., GROSINGER, C., SKUUG, N., WU, J.C., SHIH, C.K., ECKNER,K., HATTOX, S., ADAMS, J. Inhibition of hiv-1 replication by a nonnuclueoside reverse transcriptase inhibitor. **Science**, v. 250, p. 1411-13, 1990.

MEYDANI, S. N., BARKLUND, M. P., LIU, S., MEYDANI, M., MILLER, R. A., CANNON, J. G., MORROW, F. D., ROCKLIN, R., BLUMBERG, J. B. Vitamin E supplementation enhances cell-mediated immunity in healthy elderly subjects. **Am J Clin Nutr**, v. 52, p. 557-63, 1990.

MOCROFT, A., KIRK, O., BARTON, S. E., DIETRICH, M., PROENCA, R., COLEBUNDERS, R., PRADIER, C., MONFORTE, A. A., LEDERGERBER, B., LUNDGREN, J. D. Anaemia is an independent predictive marker for clinical

prognosis in HIV-infected patients from across Europe. **AIDS**, v. 13, p. 943-50, 1999.

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, 4th ed., p. 945-949, 1990.

MONROE, J. A., GODWIN, J. H., GODWING, T. A. HIV/AIDS case histories: Iron deficiency anemia and altered iron metabolism in HIV infection. **AIDS Patients Care and STDs**, v. 14(12), p. 667-69, 2000.

MONTEIRO, J. P., CUNHA, D. F. da, CUNHA, S. F. C., SANTOS, V. M. dos, JORDÃO, A. A., CORREIA, D., SILVA-VERGARA, M. L., VANNUCCHI, H., JÚNIOR, V. R., BIANCHI, M. L. P. Nutritional assessment of vitamin E in malnourished patients with AIDS. **Nutrition**, v. 16(5), p. 339-343, 2000.

MOORE, R., KERULY, J. C., CHAISSON, R. E. Anemia and survival in HIV infection. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology**, v. 19, p. 29-33, 1998.

MORETTI, S., MARCELLINI, S., SANTINI, G., ALESSE, E., BOSCHINI, A ., FAMULARO, G., STEINBERG, S.M., CIFONE, M.G., KROEMER, G., DE SIMONE, C. Apoptosis and apoptosis-associated perturbations of peripheral blood lymphocytes during HIV infections; comparison between AIDS patients and asymptomatic long-term non-progressors. **Clin Exp Immunol**, v. 122(3), p. 364-73, 2000.

OKISHIMA, N., HIRATA, K., MORIGUCHI, S. Vitamin E supplementation normalizes immune dysfunction in murine AIDS induced by LP-BM5 retrovirus infection. **Nutrition Res.**, v. 16 (10), p. 1709-1720, 1996.

OLIVIER, R. Flow cytometry technique for assessing effects of N-acetylcysteine on apoptosis and cell viability of human immunodeficiency virus infected lymphocytes. **Methods Enzymol.**, v. 251, p. 270-278, 1995.

PATRICK, L. Nutrients and HIV: part two-vitamins A and E, zinc, B-vitamins and magnesium. **Altern Med Rev**, v. 5(1), p. 39-51, 2000.

PATTON, L. L. Hematologic abnormalities among HIV-infected patients: associations of significance for dentistry. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 88(5), p. 561-7, 1999. [ABSTRACT]

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

PIETTE, J., LEGRAND-POELS, S. HIV-1 reactivation after an oxidative stress mediated by different reactive oxygen species. **Chem. Biol. Interact.**, Amsterdam, v. 91, p. 79-89, 1994.

POLI, G., PANTALEO, G., FAUCI, A. S. Immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. **Clin Infec Dis**, Chicago, v. 17 (1), p. 224-9, 1993.

POLIDORI, M. C., STAL, W., EICHLER, O., NIESTROL, I., SIES, H. Profiles of antioxidants in human plasma. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 30(5), p. 456-62, 2001.

REGNAULT, C., POSTAIRE, E. R., ROUSSET, G. J., BEJOT, M., HAZEBROUCQ, G. F. Influence of beta carotene, vitamin E, and vitamin C on endogenous antioxidant defenses in erythrocytes. **Ann Pharmacother**, v. 27(11), p. 1349-50, 1993.

RIERA A., GIMFERRER, E., CADAFARCH, J., REMACH, A., MARTINS.
Prevalence of high serum and red cell ferritin levels in HIV infected patients.
Hematologica, v. 79, p. 165-167, 1994.

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

ROMERO-ALVIRA, D., ROCHE, E. The keys of oxidative stress in acquired
immune deficiency syndrome apoptosis. **Medical Hypotheses**, v. 51, p. 169-73,
1998.

SAIF, M. W. HIV-Associated Autoimmune Hemolytic Anemia: An Update. **AIDS
Patient Care and STDs**, v. 15(3), p. 217-24, 2001.

SARAVINO, A., PESCARMONA, G. P., BOERLAERT, J. R. Iron metabolism and
HIV infection: reciprocal interations with potentially harmful consequences. **Cell
Biochem Funct**, v. 17, p. 279-87, 1999.

SATO, T., SEKINE, H., KAKUDA, H., MIURA, N., SUNOHARA, M., FUSE, A. HIV
infection of megakaryocytic cell lines. **Leuk Lymphoma**, v. 36(3-4), p. 397-404,
2000. [ABSTRACT]

SEISS, W. Molecular mechanisms of platelet activation, **Phys. Rev.**, Paris, v. 69,
p. 58-150, 1989.

SERB, P., YEUNG, S. HIV infection and the dentist. 1. The presence of the HIV in
the saliva and its implications to the pratice. **Aust. Dent. J.**, Sydney, v. 39, p. 67-
72, 1994.

SCHRECK, R., RIEBER, P., BAUERLE, P. A. Reactive oxygen intermediates as
apparently widely used messengers in the activation of the NF- κ B transcription
factor and HIV-1. **EMBO J.**, Oxford, v. 10, p. 2247-2258, 1991.

SOUZA, M. S., KARNASUTA, C., BROWN, A. E., MARKOWITZ, L. E., NITAYAPHAN, S., GARNER, R. P., McNEIL, J. G., BIRX, D. L., COX J. H. A comparative study of the impact of HIV infection in natural killer cell number and function in Thais and North Americans. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 16(11), p. 1061-6, 2000.

SPADA, C., TREITINGER, A., HOSHIKAWA-FUJIMURA, AY. HIV influence on hematopoiesis at the initial stage of infection. **Eur. J. Haematology**, v. 61, p. 255-260, 1998.

SPIGA, M. G., WEIDNER, D. A., TRENTESAUX, C., LEBOEUF, R. D., SOMMADOSSI, J. P. Inhibition of beta-globin gene expression by 3'-azido-3'-deoxythymidine in human erythroid progenitor cells. **Antiviral res**, v. 44(3), p. 167-77, 1999. [ABSTRACT]

SUZUKI, Y. J., PACKER, L. Inhibition of NF-kappa B activation by vitamin E derivatives. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 193(1), p. 227-283, 1993.

TANG, A. M., GRAHAM, N. M., SEMBA, R. D., SAAH, A. J. Association between serum vitamin A and E levels and HIV-1 disease progression. **AIDS**, v. 11(5), p. 613-620, 1997.

TANG, A. M., SMIT, E. Selected vitamins in HIV infection: A review. **AIDS Patients Care and STDs**, v. 12(4), p. 263-73, 1998.

THOMPSON J E., PHILIPS, R.J., ERDJUMENT-BROMAGE, I.T., TEMPIST, P., GHOSH, H. I κ B- β regulates the persistent response in a biophasic activation of NF κ B. **Cell**, v. 80, p. 573-82, 1995.

TREACY, M., LAI, L., COSTELLO, C., CLARK, A. Peripheral blood and bone marrow abnormalities in patients with HIV related disease. **Br. J. Haematol.**, v. 65, p. 289-293, 1987.

VAN ASBECK, B. S., GEORGIU, N. A., VAN DER BRUGGEN, T., OUDSHOORN, M., NOTTED, H. S. L. M., MARX J. J. M. Anti-HIV effect of iron chelators: different mechanisms involved. **Journal of Clinical Virology**, v. 20, p. 141-147, 2001.

VELASCO, A. A., RODRIGUEZ, F. M., PEREZ, M. A. S., CLAUDIO, G. A., ARELLANO, J. L. P., MARTIN, A. F. Iron metabolism in patient infected by human immunodeficiency virus type 1. **Sangre**, v. 42(5), p. 345-9, 1997. [ABSTRACT]

WANG, Y., WATSON R. R. Is vitamin E supplementation a useful agent in AIDS therapy? **Prog Food Nutr Sci**, v. 17(4), p. 351-375, 1993.

WANG, Y., HUANG, D. S., ESKELSON, C. D., et al. Normalization and restoration of nutritional status and immune functions by vitamin E supplementation in murine AIDS. **J Nutr**, v. 124, p. 2024-32, 1994.

WEINBERG, E. E., WEINBERG, G. A. The role of iron in infection. **Curr. Opin. In Infect. Dis.**, London, v. 8, 164-169, 1995.

www.aids.gov.br

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

ANEXOS

ANEXO I :**Termo de Consentimento**

Termo de Consentimento

Eu, _____, após ser esclarecido verbalmente sobre a presente pesquisa, aceitei espontaneamente participar da mesma, concordando em fazer uso da medicação prescrita pelos médicos durante o período de 180 dias. Da mesma forma, concordei em fornecer amostras de meu sangue a fim de que sejam realizados os testes laboratoriais que serão prescritos para avaliar o sistema de defesa imune celular, bem como o efeito da medicação ingerida sobre a infecção pelo HIV, os quais serão realizados no Laboratório do Hospital Universitário, sito no Campus da Universidade Federal de Santa Catarina, na cidade de Florianópolis. Comprometo-me também de retornar ao ambulatório médico de DST/AIDS, do Hospital Nereu Ramos 60, 120 e 180 dias após iniciada a medicação, conforme será agendado, para acompanhamento clínico e nova coleta de amostras de sangue para avaliar os efeitos do tratamento a que serei submetido. Embora os procedimentos de coleta de sangue sejam idênticos àqueles aplicados rotineiramente e que a medicação tenha sido prescrita pelos médicos, fui detalhadamente esclarecido a respeito do tratamento e dos exames laboratoriais a serem realizados. Estou ciente que, embora estes procedimentos terapêuticos apresentem efeitos colaterais mínimos, terei toda atenção médica devida, desde que manifeste minha intenção de voltar a ser atendido, além do direito a indenização, se for o caso. Sei também, que esta pesquisa é feita sem fins lucrativos para mim e para os pesquisadores, e que ela é confidencial, não sendo o meu nome objeto de qualquer de suas fases. Caso seja do meu interesse, poderei desistir de participar desta pesquisa, em qualquer etapa, precisando informar apenas aos médicos e pesquisadores a minha intenção neste sentido. Concordo com a publicação dos resultados obtidos na pesquisa e que, caso algum resultado seja de interesse clínico, eu tenha ao meu dispor todo o atendimento médico para melhoria de minha saúde. Estou consciente da importância desta pesquisa e de que receberei os resultados com explicação detalhada dos seus significados.

Florianópolis, ___/___/_____.

NOME COMPLETO: _____
 RG: _____ CPF: _____
 RUA: _____ N° _____
 CIDADE: _____
 BAIRRO: _____ CEP: _____
 TELEFONE(S) PARA CONTATO: _____

Assinatura

ANEXO II:

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

ANEXO III:
Tabelas de Resultados

1. Número de Linfócitos CD₄/mm³ dos pacientes estudados nos diferentes grupos e tempos.

Paciente	Grupo Controle				Paciente	Grupo Estudo			
	Tempo (dias)					Tempo (dias)			
	0	60	120	180		0	60	120	180
139	420	715	728	749	2	449	355	330	392
143	190	284	498	274	4	291	578	386	483
144	230	272	291	346	5	639	1057	890	870
145	291	521	808	762	6	241	495	364	474
147	639	793	415	885	7	321	432	226	279
151	298	300	490	394	9	255	258	184	204
153	413	388	582	336	11	64	111	138	62
156	471	784	517	545	12	268	281	460	360
163	446	647	346	554	18	41	154	146	157
167	236	394	96	471	19	88	225	195	215
171	45	57	420	125	21	342	771	627	773
Média	333	469	472	495		273	429	359	388
DP	161	241	197	232		175	285	231	252

2. Número de Linfócitos CD₈/mm³ dos pacientes estudados nos diferentes grupos e tempos.

Paciente	Grupo Controle				Paciente	Grupo Estudo			
	Tempo (dias)					Tempo (dias)			
	0	60	120	180		0	60	120	180
139	482	580	1010	891	2	900	607	470	589
143	481	770	1235	679	4	808	610	472	624
144	380	444	403	487	5	1987	1557	1227	1253
145	808	705	707	775	6	1190	629	480	734
147	1987	1614	1270	1414	7	731	860	557	706
151	919	613	920	729	9	777	941	613	604
153	1688	1305	1316	887	11	1308	745	1691	1741
156	1461	1494	718	881	12	612	489	624	372
163	1109	800	682	683	18	264	502	439	525
167	532	778	619	959	19	400	432	629	563
171	432	626	96	929	21	847	786	985	938
Média	934	884	816	847		893	742	744	786
DP	560	396	380	234		471	313	397	394

3. Relação de Linfócitos CD₄/CD₈ dos pacientes estudados nos diferentes grupos e tempos.

Paciente	Grupo Controle				Paciente	Grupo Estudo			
	Tempo (dias)					Tempo (dias)			
	0	60	120	180		0	60	120	180
139	0,87	1,23	0,72	0,84	2	0,5	0,58	0,7	0,67
143	0,4	0,37	0,34	0,4	4	0,36	0,95	0,82	0,77
144	0,61	0,61	0,72	0,71	5	0,32	0,68	0,73	0,69
145	0,36	0,74	0,7	0,98	6	0,2	0,79	0,76	0,65
147	0,32	0,49	0,64	0,63	7	0,44	0,5	0,41	0,4
151	0,32	0,49	0,45	0,54	9	0,33	0,27	0,3	0,34
153	0,24	0,3	0,32	0,38	11	0,05	0,15	0,08	0,04
156	0,32	0,52	0,72	0,53	12	0,44	0,57	0,74	0,97
163	0,4	0,81	0,85	0,81	18	0,16	0,31	0,33	0,3
167	0,44	0,51	0,56	0,49	19	0,22	0,52	0,31	0,38
171	0,1	0,09	0,14	0,13	21	0,4	0,98	0,64	0,82
Média	0,40	0,56	0,56	0,58		0,31	0,57	0,53	0,55
DP	0,20	0,29	0,22	0,24		0,14	0,27	0,25	0,27

4. Número de Linfócitos Viáveis em % dos pacientes estudados nos diferentes grupos e tempos.

Paciente	Grupo Controle				Paciente	Grupo Estudo			
	Tempo (dias)					Tempo (dias)			
	0	60	120	180		0	60	120	180
139	3,56	38,66	49,47	31,76	2	2,54	6,51	2,8	36,55
143	23,83	49,85		54,43	4	13,05	31,65	15,43	76,69
144	51,47	47,35	27,24	73,22	5	15,16	2,74	8,89	58,16
145	18,94	21,08	21,68	23,05	6	53,4	37,15	15,18	81,06
147	2,51	16,03	21,69	15,16	7	42,09	18,71	17,66	58,08
151	52,54	30,72	20,5	48,57	9	26,87	8,62	6,06	80,79
153	4,77	38,47	56,05	37,97	11	4,47	46,26	35,13	54,9
156	26,47	11,98	72,66	68,42	12	25,03	32,41	38,21	78,8
163	55,55	56,31	58,7	62,27	18	25,73	34,76	56,29	67,06
167	10,5	11,15	62,66	63,56	19	34,9	28,36	47,44	13,25
171	30,76	36,61	47,19	54,51	21	32,7	12,06	19,03	18,77
Média	25,54	32,56	44,75	48,54		25,09	23,57	23,83	56,77
DP	20	15	19	19		15	14	17	24

5. Número de Linfócitos Inviáveis em % dos pacientes estudados nos diferentes grupos e tempos.

Paciente	Grupo Controle				Paciente	Grupo Estudo			
	Tempo (dias)					Tempo (dias)			
	0	60	120	180		0	60	120	180
139	9,86	16,76	12,76	14,03	2	1,99	2,61	0,8	4,06
143	8,11	2,04	9,15	9,11	4	2,07	2,9	3,55	3,37
144	6,37	5,83	24,8	4,75	5	1,89	3,72	2,64	3,97
145	7,29	4,48	14,23	2,07	6	4	1,97	2,5	3,24
147	24,25	1,27	4,49	1,89	7	4,89	4,71	6,58	5,83
151	8,53	16,03	34,66	2,72	9	8,79	6,82	1,2	3,77
153	13,95	11,43	22,6	14,21	11	4,07	9,23	8,36	6,4
156	1,36	4,91	1,32	2,87	12	7,09	2,55	3,58	3,98
163	6,23	5,58	3,98	2,04	18	3,5	6,47	3,56	1,44
167	1,36	4,3	2,69	2,09	19	4,59	1,7	2,57	3,91
171	2,71	0,42	5,87	4,97	21	6,85	0,92	1,64	3,09
Média	8,18	6,64	12,41	5,52		4,52	3,96	3,36	3,91
DP	6,52	5,63	10,77	4,74		2,26	2,57	2,27	2,32

6. Número de Linfócitos em apoptose em % dos pacientes estudados nos diferentes grupos e tempos.

Paciente	Grupo Controle				Paciente	Grupo Estudo			
	Tempo (dias)					Tempo (dias)			
	0	60	120	180		0	60	120	180
139	86,58	44,58	37,77	54,21	2	95,47	90,88	96,39	59,29
143	68,06	47,04	34,42	36,4	4	84,88	65,45	81,02	19,94
144	42,16	46,82	47,96	22,03	5	82,85	93,53	88,47	37,87
145	73,77	73,71	74,09	74,88	6	42,6	60,87	82,32	15,70
147	73,24	82,69	73,57	82,95	7	53,03	75,58	75,75	36,09
151	38,93	53,25	44,84	48,71	9	64,34	84,57	92,78	15,44
153	81,28	50	21,35	47,82	11	91,45	44,51	56,51	38,7
156	72,17	83,11	26,02	28,71	12	67,88	65,04	58,14	17,22
163	38,22	38,14	37,32	35,69	18	70,77	58,77	40,15	31,5
167	88,14	84,55	34,65	34,38	19	60,51	69,95	49,99	82,84
171	66,53	62,96	46,94	40,52	21	60,65	87,02	79,33	78,02
Média	66,28	60,62	43,53	46,02		70,40	72,37	72,80	39,32
DP	18,37	17,45	17,03	18,74		16,57	15,37	18,64	24,20

7. Carga Viral em número de cópias/ml dos pacientes estudados nos diferentes grupos e tempos.

Paciente	Grupo Controle				Paciente	Grupo Estudo			
	Tempo (dias)					Tempo (dias)			
	0	60	120	180		0	60	120	180
139	110000	5300	780	7300	2	55000	6300	240	80
143	190000	6800	80	80	4	48000	1100	4100	1200
144	75000	12000	370	160	5	110000	7900	1200	760
145	48000	1600	80	80	6	45000	1800	5100	1600
147	110000	2300	850	770	7	58000	28000	14000	3400
151	55000	2500	1400	2000	9	140000	1000	230	9000
153	720000	80	120	11000	11	310000	1200	1400	310
156	48000	8200	370	4600	12	200000	480	310	
163	73000	80	180	430	18	80000	3800	80	160
167	430000	9000	430	460	19	170000	1300	1300	80
171	110000	1600	1400	3100	21	170000	1400	1800	130
Média	110649	4011	493	3583		126000	4935	2705	1672
DP	120090	4496	551	2725		82512	8021	4084	2775

8. Número de Leucócitos/mm³ dos pacientes estudados nos diferentes grupos e tempos.

Paciente	Grupo Controle				Paciente	Grupo Estudo			
	Tempo (dias)					Tempo (dias)			
	0	60	120	180		0	60	120	180
139	4500	4900	4700	4500	2	4400	4000	4200	4800
143	7800	1100	9000	8500	4	4300	3600	4500	4300
144	5600	3700	5000	3800	5	6600	9300	9300	8100
145	4300	4400	3700	4000	6	5000	3400	4000	4700
147	6600	8900	8100	8200	7	3500	3500	3600	3300
151	5100	3100	5500	4900	9	4700	4700	4300	5300
153	6000	4900	4600	4000	11	7100	8100	7700	6700
156	6200	6100	5000	5200	12	5400	4500	5700	3700
163	7000	4400	6400	7100	18	3500	3100	4100	3400
167	8200	3400	3700	4300	19	3700	4100	3700	3700
171	2700	2100	2700	4300	21	4500	5100	5300	7100
Média	5818	4272	5309	5345		4790	4854	5127	5009
DP	1616	2069	1889	1740		1184	2010	1817	1626

9. Número de Linfócitos/mm³ dos pacientes estudados nos diferentes grupos e tempos.

Paciente	Grupo Controle				Paciente	Grupo Estudo			
	Tempo (dias)					Tempo (dias)			
	0	60	120	180		0	60	120	180
139	1503	2239	2251	2268	2	1483	1392	1201	1296
143	967	1333	1782	1148	4	1535	1508	1323	1527
144	913	855	955	1075	5	2350	3069	2399	2422
145	1532	1923	1425	1800	6	1775	1244	996	1321
147	2350	2545	2373	3362	7	1316	1649	1134	1231
151	1459	1088	1458	1274	9	1349	1612	1097	1140
153	3060	2161	2213	1628	11	1569	1150	2179	2144
156	2375	2471	1625	2397	12	1026	1206	1345	1062
163	2065	1742	1638	1775	18	2695	741	767	748
167	1550	1486	1395	1750	19	821	1558	1203	1547
171	1026	966	969	1126	21	1422	1953	2157	2961
Média	1709	1710	1644	1782		1576	1552	1436	1581
DP	679	605	481	687		540	594	545	660

10. Número de Plaquetas x 10³/mm³ dos pacientes estudados nos diferentes grupos e tempos.

Paciente	Grupo Controle				Paciente	Grupo Estudo			
	Tempo (dias)					Tempo (dias)			
	0	60	120	180		0	60	120	180
139	210	231	237	204	2	148	191	198	181
143	180	486	254	227	4	181	184	199	213
144	272	214	250	245	5	301	313	338	356
145	181	212	213	188	6	199	198	169	267
147	301	312	350	282	7	127	110	150	133
151	195	152	256	237	9	250	275	268	247
153	147	259	197	190	11	163	310	323	181
156	217	246	239	237	12	210	220	219	216
163	170	250	235	268	18	80	110	145	204
167	290	304	319	306	19	156	236	206	203
171	234	309	358	319	21	33	200	256	239
Média	218	270	264	245		168	213	224	231
DP	51	86	53	44		74	68	65	68

11. Número de Eritrócitos em milhões/mm³ dos pacientes estudados nos diferentes grupos e tempos.

Paciente	Grupo Controle				Paciente	Grupo Estudo			
	Tempo (dias)					Tempo (dias)			
	0	60	120	180		0	60	120	180
139	4,14	3,46	3,23	3,64	2	3,48	4,00	3,56	4,51
143	4,50	3,37	3,44	3,82	4	3,63	3,75	4,20	4,65
144	5,02	4,48	4,80	4,32	5	3,26	3,41	3,80	3,70
145	4,51	3,88	4,10	3,63	6	3,56	3,32	3,11	3,70
147	4,51	3,95	3,44	3,26	7	4,20	3,81	3,88	3,90
151	3,65	1,74	2,41	2,79	9	4,38	4,13	4,04	3,55
153	5,18	4,15	4,10	4,10	11	4,42	3,32	3,13	4,08
156	4,61	4,19	4,46	4,44	12	4,35	3,58	3,36	4,20
163	4,96	3,89	3,31	3,39	18	3,70	3,45	3,10	3,14
167	4,79	4,02	3,89	4,16	19	3,68	3,27	2,75	3,90
171	4,58	3,31	3,08	3,36	21	4,46	4,60	4,43	4,86
Média	4,58	3,67	3,66	3,71		3,91	3,69	3,57	4,02
DP	0,42	0,73	0,68	0,50		0,44	0,41	0,53	0,51

12. Hematócrito em % dos pacientes estudados nos diferentes grupos e tempos.

Paciente	Grupo Controle				Paciente	Grupo Estudo			
	Tempo (dias)					Tempo (dias)			
	0	60	120	180		0	60	120	180
139	38,8	33,8	33,7	37,8	2	46,9	40,9	42,6	43,4
143	44,7	36,2	40,9	43,7	4	42,9	44,3	43,4	44,1
144	46,7	43,1	44,2	45,5	5	38,6	36,6	35,5	36,5
145	42,9	40,2	40,3	43,2	6	40,2	35,6	33,2	36,3
147	38,6	38,4	36,7	35,1	7	41,1	38,1	39	38,9
151	36,4	17,3	32,4	34,5	9	38	41	42	38,5
153	45	40,3	40,5	40,5	11	39,4	32,6	34,2	42,7
156	38,7	36,2	37,7	39,5	12	39,8	36,1	37,3	40,4
163	45,4	38	38	40,3	18	35,7	38,9	37,6	38,7
167	39,5	34,8	35,9	39,5	19	36,8	37,1	35,1	37,7
171	40,6	32,1	35,1	35,8	21	37,9	40,1	39,8	42,7
Média	41,6	35,5	37,7	39,6		39,7	38,3	38,2	39,9
DP	3,4	6,8	3,4	3,6		3,1	3,2	3,5	2,8

13. Hemoglobina em g/dl dos pacientes estudados nos diferentes grupos e tempos.

Paciente	Grupo Controle				Paciente	Grupo Estudo			
	Tempo (dias)					Tempo (dias)			
	0	60	120	180		0	60	120	180
139	12,5	11,7	11,4	12,6	2	15,5	14,4	14,6	14,9
143	15,8	12,1	14	15,6	4	14,4	15,1	15	15
144	15,6	15,3	15,5	16	5	13,2	12,5	12,5	12,3
145	14,4	13,2	13,9	14,7	6	13,2	11,9	11,8	12
147	13,2	12,8	12,7	11,7	7	14,2	13,3	14,2	13,3
151	12	6,1	11,4	12	9	13	14,2	14,3	13,4
153	15,2	13,7	13,7	14,2	11	13,4	11,2	12	14,3
156	12,9	12,4	12,9	13,2	12	14,1	12,5	13,1	13,8
163	15,8	13,1	13,2	13,9	18	12,3	13,7	13,3	13,2
167	13,3	11,7	12,3	13	19	13	12,8	12,3	12,6
171	14,1	11,4	12,1	13,2	21	13,4	13,8	13,3	14,6
Média	14,1	12,1	13,0	13,6		13,6	13,2	13,3	13,6
DP	1,4	2,3	1,2	1,4		0,8	1,2	1,1	1,0

14. Níveis séricos de Ferritina em ng/dl dos pacientes estudados nos diferentes grupos e tempos.

Paciente	Grupo Controle				Paciente	Grupo Estudo			
	Tempo (dias)					Tempo (dias)			
	0	60	120	180		0	60	120	180
139	30,3	24,3	23,9	16,5	2	341	272	280	288
143	42,5	247	89,6	77,3	4	135	97,2	116	84
144	121	103	92,1	77,6	5	59,6	49,9	71,4	59,6
145	135	105	95,7	85,5	6	85,5	150	60,7	64,1
147	59,6	166,6	57,9	57,7	7	14,9	177	232	198
151	396	416	226	287	9	138	67,7	44,6	59,2
153	116	118	98,3	73,3	11	2998	1080	792	1244
156	11	9,2	10	9,6	12	360	337	233	231
163	76	91,8	78,6	59,4	18	1496	384	250	286
167	88,2	172	149	150	19	1500	1195	1696	2190
171	1956	968	733	664	21	190	178	168	122
Média	275,6	220,1	150,4	141,6		665,3	362,5	358,5	433,3
DP	556	272	201	189		945	398	489	673

15. Níveis de Ferro Sérico em $\mu\text{g/dl}$ dos pacientes estudados nos diferentes grupos e tempos.

Paciente	Grupo Controle				Paciente	Grupo Estudo			
	Tempo (dias)					Tempo (dias)			
	0	60	120	180		0	60	120	180
139	69	65	78	54	2	285	216	214	121
143	83	83	164	122	4	120	96	74	133
144	74	104	1047	133	5	128	74	32	60
145	120	98	69	198	6	90	133	118	135
147	59,6	128	101	60	7	56	71	44	58
151	82	156	80	119	9	52	46	38	35
153	116	47	79	77	11	80	89	93	85
156	50	71	60	63	12	40	135		176
163	76	132	70	45	18	111	135	59	122
167	88,2	40	136	113	19		186	267	197
171	147	93	48	63	21		94	85	97
Média	252	97	94	94		87	116	93	111
DP	565	40	31	47		79	51	80	50

16. Níveis de Transferrina em mg/dl dos pacientes estudados nos diferentes grupos e tempos.

Paciente	Grupo Controle				Paciente	Grupo Estudo			
	Tempo (dias)					Tempo (dias)			
	0	60	120	180		0	60	120	180
139	328	264	265	307	2	180	203	178	161
143	179	179	232	236	4	194	212	164	170
144	252	245	251	238	5	354	226	181	207
145	194	196	207	199	6	214	182	150	129
147	354	273	243	243	7	257	230	189	214
151	205	183	261	234	9	157	214	167	166
153	177	174	166	147	11	130	230	243	244
156	302	289	286	284	12	170	161		175
163	222	224	136	194	18	98	180	269	303
167	150	200	174	154	19		176	224	175
171	160	130	110	89	21		226	233	235
Média	229	214	211	211		195	203	200	198
DP	70	49	58	63		75	25	39	49

17. Níveis séricos de Haptoglobina em mg/dl dos pacientes estudados nos diferentes grupos e tempos.

Paciente	Grupo Controle				Paciente	Grupo Estudo			
	Tempo (dias)					Tempo (dias)			
	0	60	120	180		0	60	120	180
139	262	127	144	215	2	168	124	99,9	108
143	195	448	201	187	4	102	28,2	29,9	29
144	184	91,3	63,6	50,9	5	191	144	153	189
145	102	36	24	29,2	6	127	43,7	40,2	85,2
147	191	143	187	106	7	55,2	25,2	29	31,9
151	169	94,7	17,2	45	9	284	95,2	164	188
153	151	64,9	80,5	59,1	11	29	281	229	212
156	100	167	179	78,3	12	168	72,4	96,5	113
163	155	172	109	178	18	29	29	29	29
167	200	104	83,5	102	19	130	58,1	29	204
171	239	144	135	102	21	243	156		173
Média	177	145	111	105		139	96	90	115
DP	50	109	63	62		83	77	71	68