



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

**EFEITO DOS ANTIOXIDANTES ASCORBATO E
N-ACETIL-CISTEÍNA ASSOCIADOS À TERAPIA ANTIRRETROVIRAL
EM PACIENTES HIV POSITIVOS**

**Dissertação de Mestrado, apresentada
como requisito parcial à obtenção do
título de Mestre em Farmácia, com
ênfase em Imunologia, na Universidade
Federal de Santa Catarina – UFSC
Orientador: Prof. Dr. Celso Spada**

JOEL DA CUNHA

Florianópolis (SC)

2005

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

**EFEITO DOS ANTIOXIDANTES ASCORBATO E
N-ACETIL-CISTEÍNA ASSOCIADOS À TERAPIA ANTIRRETROVIRAL
EM PACIENTES HIV POSITIVOS**

JOEL DA CUNHA

Florianópolis (SC)

2005

A DEUS, que a nós tudo permite.

*À minha avó Elfrida (in memmorium), pelo exemplo de honestidade e
perseverança.*

À minha mãe Vilma, à qual a vida iimpôs vários obstáculos desnecessários.

Aos meus irmãos Edílson, Silvana e Simone, valeu!

***Bruno (in memmorium),
Saudades de um grande amigo (07 janeiro/2004)!!!***

MINHA SINCERA GRATIDÃO

À Universidade Federal de Santa Catarina, em nome do Magnífico Reitor Lúcio Botelho.

Ao Centro de Ciências da Saúde, em nome do seu Diretor Prof. Cléo Nunes de Souza, pelo seu real apoio.

Ao Prof. Dr. Celso Spada, pela amizade, orientação, ensinamento, incentivo e a oportunidade de ter realizado este trabalho.

Ao Prof. Dr. Arício Treitinger, no auxílio como co-orientador.

Aos meus professores Márcio Alvarez, Marcos Machado, Danilo W. Filho, pelo grande ensinamento científico e humano.

Aos meus colegas funcionários do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário, pela viabilização das análises necessárias à realização deste trabalho.

Ao Dr. Júlio César Verdi, médico infectologista do ambulatório DST/AIDS de Florianópolis (SC), por todo o auxílio indispensável para o sucesso deste trabalho e de outros que já foram realizados por nosso grupo de pesquisa.

Ao Laboratório Médico Santa Luzia, minhas colegas Débora e da Dra. Silvia Inês Córdoba Pires Ferreira, por toda atenção e dedicação dispensada.

À Prof. Dra. Dulcinéia Saes Parra Abdalla e ao colega Maurício, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela viabilização dos ensaios cromatográficos.

Aos meus colegas Jair, Aldo, Rodrigo, Roderigo, Ledenir, Luci e Marta da secretaria do CCS. Obrigado pela atenção, paciência, telefone, fax, café, respeito e por suas amizades.

Aos colegas de laboratório, Odilon, Renata, Kelly e Alexandro, pela contribuição indispensável na realização de nossas técnicas laboratoriais.

Aos colegas Marcelo, Teófilo, Danuza, Lorena, Alexandre, Marli. Valeu!!!

Aos meus colegas, de grandes festas, do grupo cpeeel@yahoogrupos.com.br.

À Giane Delai, que surgiu de maneira inesperada e que agora faz parte de minha vida.

E aqueles que foram as peças-chave em tudo isso, e que me ensinaram muito mais do que pude ensinar-lhes, os pacientes portadores do HIV.

RESUMO

A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) resulta em alterações efetivas e complexas no sistema imunológico, caracterizada por uma depleção de linfócitos CD4+, as quais acompanham o aumento progressivo dos níveis plasmáticos da carga viral. Entre os mecanismos envolvidos nesta progressão, está a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), proveniente do estresse oxidativo gerado pela própria ativação crônica do sistema imune. A ação de EROs, assim como por constituintes virais, favorece a replicação viral via ativação de NF- κ B e a depleção de linfócitos por apoptose, com conseqüente comprometimento do sistema imune. O objetivo desse estudo, duplo cego, controlado por placebo, foi investigar e comparar o possível efeito dos compostos antioxidantes ascorbato (Cewin[®], 2g/dia) e N-Acetil-Cisteína (NAC)(Fluimucil[®],600mg/dia), quando associados ao efeito inibidor da replicação viral dos antirretrovirais, através de parâmetros virológicos e celulares em pacientes soropositivos para o HIV-1. Foram avaliados: a carga viral do HIV-1, linfócitos CD4+, CD8+, relação CD4/CD8, percentual de células vivas, em apoptose e mortas, globulinas, IgA, IgG, IgM e β -2 microglobulina. Participaram do estudo 38 pacientes; destes, 13 foram suplementados com ascorbato 2g/dia, 10 suplementados com NAC, 800 mg/dia, e 15 fizeram uso de placebo. As análises foram realizadas antes do início do tratamento e após 60, 120 e 180 dias. Os resultados obtidos demonstraram significativa diminuição da carga viral em todos os grupos, em decorrência da terapia antirretroviral, acompanhada de um aumento significativo no número de linfócitos CD4+ e relação CD4/CD8, bem como diminuição significativa dos níveis de globulinas, IgA, IgG, IgM. Os resultados demonstraram ainda, um efeito significativo da suplementação com ascorbato sobre o percentual de linfócitos vivos, em apoptose, e sobre os níveis de β -2 Microglobulina. Neste estudo, conclui-se que a suplementação com ascorbato, 2g/dia, via oral, associada à terapia antirretroviral, propiciou um aumento na viabilidade dos linfócitos circulantes em pacientes HIV+, o que sugere um efeito benéfico na reconstituição do sistema imune nos pacientes que fazem uso do ascorbato. A NAC, entretanto, não apresentou nenhum resultado significativo.

Unitermos: Ascorbato; N-acetil-cisteína; HIV; terapia antirretroviral; estresse oxidativo; apoptose.

ABSTRACT

The infection of the human immunodeficiency virus (HIV) results in effective and complex alterations in the immunological system, characterized by a depletion of lymphocyte CD4+, which follows a gradual increase in plasma viraemia. Amongst the mechanisms contributing to this progression, is the production of reactive oxygen species (ROS), derived from oxidative stress generated by chronic activation of the immune system. The action of ROS, as well as those of viral products, favors the viral response saw in activation of NF- κ B pathway and the depletion of lymphocytes by apoptosis, with consequent commitment of the immune system. The objective of this study, double-blind, placebo controlled, was to investigate and to compare the possible effect of the antioxidant compounds ascorbate (Cewin[®], 2 g daily) and N-acetylcysteine (NAC) (Fluimucil[®], 600 mg daily) when associated with the inhibiting effect of the viral response of the antiretrovirals, through virologic and cellular parameters in HIV-1 infected patients. Viral load of the HIV-1, lymphocytes CD4+, CD8+, CD4/CD8, ratio of living, apoptotic and dead cells, globulines, IgA, IgG, IgM and β -2 microglobuline. Were evaluated 38 patients participated in the study, 13 had been supplemented with ascorbate (2 g/day), 10 supplemented with NAC (600 mg/day), and 15 use placebo. Analyses were carried out before and after 60, 120 and 180 days of treatment. The results demonstrated a significant reduction of the viral load in all groups, as a consequent of the antiretroviral therapy, followed by a significant increase in the number of lymphocytes CD4+ and the ratio CD4/CD8, as well as significant reduction in the levels of globulines, IgA, IgG, IgM. The results also showed a significant effect on the supplementation with ascorbate on the percentage of living and under apoptosis lymphocytes, and on the levels of β -2 microglobuline. It is concluded that the supplementation of ascorbate, associated with antiretroviral therapy, propitiated an increase in the viability of the circulating lymphocytes in HIV+ patients, indicating a beneficial effect in the recovery of the immune system in patients who were supplemented with ascorbate. However, NAC, did not present any significant result.

KEY WORDS: Ascorbate; N-acetylcysteine; HIV; antiretroviral therapy, oxidative stress; apoptosis.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Níveis basais de RNA do HIV-1 (cópias/mL) nos pacientes do grupo Controle, Ascorbato e NAC.....	62
Tabela 2	Níveis basais de linfócitos CD4+/mm ³ , nos pacientes do grupo Controle, Ascorbato e NAC.....	108
Tabela 3	Níveis basais de linfócitos CD8+/mm ³ , nos pacientes do grupo Controle, Ascorbato e NAC.....	109
Tabela 4	Níveis basais de linfócitos CD4/CD8 nos pacientes do grupo Controle, Ascorbato e NAC.	110
Tabela 5	Níveis basais de linfócitos vivos em percentual (%) nos pacientes do grupo Controle, Ascorbato e NAC.....	111
Tabela 6	Níveis basais de linfócitos em apoptose, em percentual (%), nos pacientes do grupo Controle, Ascorbato e NAC.....	112
Tabela 7	Níveis basais de linfócitos mortos, em percentual (%), nos pacientes do grupo Controle, Ascorbato e NAC.....	113
Tabela 8	Níveis basais de globulinas (g/dL), nos pacientes do grupo Controle, Ascorbato e NAC.....	114
Tabela 9	Níveis séricos basais de IgA (mg/dL), nos pacientes do grupo Controle, Ascorbato e NAC.	115
Tabela 10	Níveis séricos basais de IgG (mg/dL), nos pacientes do grupo Controle, Ascorbato e NAC.....	116
Tabela 11	Níveis séricos basais de IgM (mg/dL), nos pacientes do grupo Controle, Ascorbato e NAC.....	117
Tabela 12	Níveis séricos basais de β-2 Microglobulina, nos pacientes do grupo Controle, Ascorbato e NAC.....	118

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Classificação da infecção pelo HIV.....	30
Quadro 2	Recomendações para início da terapia Antirretroviral em adultos e adolescentes infectados pelo HIV – 2004.....	35
Quadro 3	Esquema da terapia Antirretroviral recomendada para adultos e adolescentes infectados pelo HIV - 2004.....	35
Quadro 4	Protocolos dos tratamentos antirretrovirais a que foram submetidos os pacientes durante o estudo.....	51
Quadro 5	Valores de RNA do HIV-1 dos grupos controle, e suplementados com ascorbato e NAC.....	120
Quadro 6	Valores de linfócitos CD4+ dos grupos controle, e suplementados com ascorbato e NAC.....	121
Quadro 7	Valores de linfócitos CD8+ dos grupos controle, e suplementados com ascorbato e NAC.....	122
Quadro 8	Valores da relação CD4/CD8 dos grupos controle, e suplementados com ascorbato e NAC.....	123
Quadro 9	Valores do percentual de linfócitos vivos dos grupos controle, e suplementados com ascorbato e NAC.....	124
Quadro 10	Valores do percentual de linfócitos em apoptose dos grupos controle, e suplementados com ascorbato e NAC.....	125
Quadro 11	Valores do percentual de linfócitos mortos dos grupos controle, e suplementados com ascorbato e NAC.....	126
Quadro 12	Valores dos níveis séricos de globulinas dos grupos controle, e suplementados com ascorbato e NAC.....	127
Quadro 13	Valores dos níveis séricos de IgA dos grupos controle, e suplementados com ascorbato e NAC.....	128
Quadro 14	Valores dos níveis séricos de IgG dos grupos controle, e suplementados com ascorbato e NAC.....	129
Quadro 15	Valores dos níveis séricos de IgM dos grupos controle, e suplementados com ascorbato e NAC.....	130
Quadro 16	Valores dos níveis séricos de β -2 microglobulina dos grupos controle, e suplementados com ascorbato e NAC.....	131

LISTA DE FIGURAS

Figura 1a	Chimpanzé sub-espécie <i>Pan troglodytes troglodytes</i>	19
Figura 1b	Macaco da espécie <i>Cercocebus atys</i> ,.....	19
Figura 2	Estrutura do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1).....	20
Figura 3	Estrutura genômica do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1).....	21
Figura 4	Mecanismo de entrada do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1)	24
Figura 5	Ciclo de Replicação Viral do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1).....	26
Figura 6	Evolução clínica dos indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1).....	32
Figura 7	Evolução temporal da resposta imunológica em indivíduos infectados pelo HIV-1.....	33
Figura 8	Distribuição das células e/ou estruturas selecionadas, através do CELLQuest.....	54
Figura 9	Distribuição das células selecionadas, através do PAINT A GATE.....	55
Figura 10	Distribuição dos linfócitos, obtida através do PAINT A GATE..	56
Figura 11	Resultado final da avaliação da viabilidade celular de linfócitos.....	57
Figura 12	Linfócitos CD4+ (células/mm ³) nos grupos Controle, e suplementados com Ascorbato e N-Acetil-Cisteína	63
Figura 13	Linfócitos CD8+ (células/mm ³) nos grupos Controle, e suplementados com Ascorbato e N-Acetil-Cisteína	64
Figura 14	Relação CD4/CD8 nos grupos Controle, e suplementados com Ascorbato e N-Acetil-Cisteína	65
Figura 15	Linfócitos vivos (%) nos grupos Controle, e suplementados com Ascorbato e N-Acetil-Cisteína	66
Figura 16	Linfócitos em apoptose (%) nos grupos Controle, e suplementados com Ascorbato e N-Acetil-Cisteína	67
Figura 17	Linfócitos mortos (%) nos grupos Controle, e suplementados com Ascorbato e N-Acetil-Cisteína	68
Figura 18	Níveis séricos de globulinas, nos grupos Controle, e suplementados com Ascorbato e N-Acetil-Cisteína	69
Figura 19	Níveis séricos de IgA, nos grupos Controle, e suplementados com Ascorbato e N-Acetil-Cisteína	70
Figura 20	Níveis séricos de IgG, nos grupos Controle, e suplementados com Ascorbato e N-Acetil-Cisteína	71
Figura 21	Níveis séricos de IgM, nos grupos Controle, e suplementados com Ascorbato e N-Acetil-Cisteína	72
Figura 22	Níveis séricos de β-2 Microglobulina, nos grupos Controle, e suplementados com Ascorbato e N-Acetil-Cisteína	73

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência Adquirida
AIF	Fator Indutor de Apoptose
Apaf-1	Fator de Ativação de Proteases Pró-apópticas
ARV	AIDS Associada a Retrovírus
CAD	DNase Ativada por Caspase
CCR5	Receptor de Quimiocina
cDNA	Próvirus do HIV
CD4	Grupamento de Diferenciação Linfócitos T auxiliares (<i>CD = Cluster Differentiation</i>)
CD8	Grupamento de Diferenciação de Linfócitos T citotóxicos
CD40	Grupamento de Diferenciação de Linfócitos T B
CD40L	Grupamento de Diferenciação de Linfócitos T ativados (Sinônimo: CD154)
CD95	Grupamento de Diferenciação de vários tipos celulares (Sinônimo: Fas, APO-1)
CD95L	Grupamento de Diferenciação de Linfócitos T ativados (Sinônimo: Ligante Fas)
CDC	<i>Center for Diseases Control and Prevention</i>
CTL	Linfócito T Citotóxico
CXCR4	Receptor de Quimiocina
DED	Domínios Efetores de Morte
DISC	Complexos Sinalizadores da Indução da Morte
DNA	Acido Desoxirribonucléico
DST	Doença Sexualmente Transmissível
EBV	Epstein-Baar vírus
ELISA	Enzima Imunoensaio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FADD	Proteína Associada ao Domínio de Morte fas
Fas	ver CD95
FasL	ver CD95L
FLASH	Proteínas Adaptadoras (FLICE - associated huge protein)
FLIP	Proteínas Inibidoras (FLICE - inhibitory protein)
g	Gramas
<i>g</i>	Giros
Gp 41	Glicoproteína 41
Gp 120	Glicoproteína 120 do HIV
Gp 160	Glicoproteína 160 do HIV
GSH	Glutathiona Reduzida
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HIV-1	Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 1
HIV-2	Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 2
HTLV -III	Vírus Linfotrópico Humano Tipo III

HSV	Vírus Herpes Simples
HU	Hospital Universitário
IDAV	Vírus Associado à Imunodeficiência
IFI	Imunofluorescência Indireta
I- κ B	Proteína Inibitória Kappa B
IFN- γ	Interferon – gama
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
INT	Integrase
IP	Inibidor de Protease
ITRN	Inibidor da Transcriptase Reversa Nucleosídico
ITRNN	Inibidor da Transcriptase Reversa Não Nucleosídico
LAV	Vírus Associado à Linfadenopatia
LTR	Repetição terminal Longa
NF - κ B	Fator de Transcrição Nuclear Kappa B
OMS	Organização mundial da Saúde
PCR	Reação de Polimerase em Cadeia
PT	Protease
RH	Ribonuclease
RNA	Ácido Ribonucléico
RNA _m	RNA mensageiro
RT	Transcriptase Reversa
SIV	Vírus da Imunodeficiência de Símios
TARV	Terapia Anti-retroviral
TCR	Receptor de Células T
TGF- β	Fator Beta de Transformação e Crescimento
Th - 1	Linfócitos T auxiliares Tipo -1
Th - 2	Linfócitos T auxiliares Tipo-2
TNF - α	Fator de Necrose Tumoral
TNF-R	Receptor do Fator de Necrose Tumoral
TRADD	Proteína Associada ao Domínio de Morte TNFR1
UNAIDS	Programa das Nações Unidas para o HIV /AIDS

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	17
1.2. O HIV.....	19
1.3. EPIDEMIOLOGIA DO HIV/AIDS.....	25
1.3.1 Epidemiologia Mundial do HIV/AIDS.....	25
1.3.2 Epidemiologia do HIV/AIDS no Brasil.....	27
1.4. DIAGNÓSTICO E ESTADIAMENTO DA INFECÇÃO PELO HIV.....	28
1.5. EVOLUÇÃO DA INFECÇÃO PELO HIV.....	31
1.6. IMUNIDADE CELULAR.....	36
1.7. IMUNIDADE HUMORAL.....	37
1.8. APOPTOSE.....	39
1.9. N-ACETIL-CISTEÍNA.....	43
1.10. ASCORBATO.....	45
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	48
3. PACIENTES, MATERIAIS E MÉTODOS.....	50
3.1. CASUÍSTICA.....	50
3.2. FRACIONAMENTO DA AMOSTRA BIOLÓGICA (SANGUE).....	52
3.3. ISOLAMENTO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES.....	52
3.4. ENSAIO DA VIABILIDADE CELULAR.....	52
3.5. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE RNA DO HIV-1.....	57
3.6. QUANTIFICAÇÃO DE LINFÓCITOS CD4+ E CD8+.....	59
3.7. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE GLOBULINAS.....	59
3.8. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS IgA, IgG, IgM.....	60
3.9. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE β-2 MICROGLOBULINA.....	60
4. INFERÊNCIA ESTATÍSTICA.....	61
5. RESULTADOS.....	62
5.1. NÍVEIS PLASMÁTICOS DO RNA DO HIV-1 (CARGA VIRAL).....	62
5.2. NÚMERO DE LINFÓCITOS CD4+.....	63
5.3. NÚMERO DE LINFÓCITOS CD8+.....	64
5.4. RELAÇÃO LINFÓCITOS CD4/CD8.....	65

5.5. PERCENTUAL DE LINFÓCITOS VIVOS.....	66
5.6. PERCENTUAL DE LINFÓCITOS EM APOPTOSE.....	67
5.7. PERCENTUAL DE LINFÓCITOS MORTOS.....	68
5.8. NÍVEIS SÉRICOS DE GLOBULINAS.....	69
5.9. NÍVEIS SÉRICOS DE IgA.....	70
5.10. NÍVEIS SÉRICOS DE IgG.....	71
5.11. NÍVEIS SÉRICOS DE IgM.....	72
5.12. NÍVEIS SÉRICOS DE β -2 MICROGLOBULINA.....	73
6. DISCUSSÃO.....	74
6.1. NÍVEIS PLASMÁTICOS DE RNA DO HIV-1.....	74
6.2. LINFÓCITOS CD4+, CD8+, RELAÇÃO CD4/CD8.....	76
6.3. LINFÓCITOS VIVOS, EM APOPTOSE, MORTOS.....	78
6.4. GLOBULINAS, IgA, IgG, IgM, β -2 MICROGLOBULINA.....	81
7. CONCLUSÕES.....	84
8. PERSPECTIVAS.....	85
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86
10. ANEXOS.....	104
10.1. ANEXO 1. Fluxograma para diagnósticos da infecção pelo HIV-1....	105
10.2. ANEXO 2. Tabela de resultados estatísticos dos marcadores avaliados.....	107
10.3. ANEXO 3. Quadro com resultados dos marcadores avaliados em pacientes nos grupos Estudo e Controle	119
10.4. ANEXO 4. Parecer do Comitê de Pesquisa em seres Humanos da Universidade federal de Santa Catarina – UFSC.....	132
10.5. ANEXO 5. Termo de Consentimento dos Pacientes HIV+.....	133

1. INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A síndrome da imunodeficiência adquirida, AIDS, foi descrita como uma nova patologia clínica em 1981, nos Estados Unidos da América (EUA), pelo *Centers for Disease Control and Prevention (CDC)* de Atlanta, Geórgia, a partir da constatação de que havia um número elevado de adultos homossexuais, do sexo masculino, residentes nas cidades de Los Angeles, Nova York e San Francisco, que apresentavam infecções consideradas raras em indivíduos imunocompetentes, como sarcoma de Kaposi (neoplasia cutâneo vascular), pneumonia por *Pneumocystis carinii* (fungo cuja denominação foi recentemente modificada para *Pneumocystis jiroveci*), uma afecção freqüente em pacientes imunocomprometidos, e outras infecções oportunistas (CDC, 1981a, b; CDC, 1982a; BLATNER, 1991).

A partir destes casos, o CDC começou posteriormente a relatar a mesma síndrome em usuários de drogas injetáveis (CDC, 1982a), hemofílicos (CDC, 1982b), hemotransfundidos (CDC, 1982c), crianças nascidas de mães infectadas, denominada transmissão vertical (CDC, 1982d), e em parceiros sexuais de indivíduos infectados pelo HIV (CDC, 1983).

A primeira indicação de que a AIDS poderia ser causada por um retrovírus surgiu em 1983, quando Barré-Sinoussi e colaboradores do Instituto Pasteur na França, conseguiram isolar de um paciente com linfadenopatia, um retrovírus que foi denominado de vírus associado à linfadenopatia (*Lymphadenopathy Associated Virus - LAV*). Simultaneamente, o grupo de estudos de Robert Gallo, 1983, do CDC dos EUA, relatou o isolamento de um novo vírus linfotrópico de células T humanas (*Human T Cell Lymphotropic Virus Type III - HTLV-III*).

Posteriormente ficou comprovado que o vírus descrito por Gallo era o mesmo vírus isolado por Barré-Sinoussi e colaboradores. Outros pesquisadores usaram denominações diferentes como *Immunodeficiency-Associated Virus (IDAV)*. No ano seguinte, Levy e colaboradores (1984) descreveram o primeiro isolamento do vírus em indivíduos assintomáticos, indicando o estado de portador, denominando-o de retrovírus associado à AIDS (*AIDS - Associated Retrovirus (ARV)*).

A partir destas descobertas e com o objetivo de evitar confusões em decorrência das várias terminologias empregadas para um mesmo agente, em 1986, o *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) recomendou a denominação de vírus da imunodeficiência humana (*Human Immunodeficiency Virus* - HIV) (COFFIN et al., 1986). Neste mesmo ano, Clavel e colaboradores (1986) isolaram e identificaram um segundo agente patogênico em indivíduos com AIDS na região ocidental da África, que foi denominado de HIV tipo 2 (HIV-2).

O vírus do tipo HIV-1 é mais virulento e disseminado pelo mundo, já o HIV-2 parece ser menos patogênico e possui pouca transmissibilidade, sendo encontrado quase que exclusivamente no Oeste da África, estando associado a infecções com longos períodos assintomáticos (COLLIER; OXFORD, 1993; UNAIDS, 1997).

Embora permaneça a controvérsia, e ainda não se saiba ao certo a origem do HIV-1 e do HIV-2, pesquisas demonstraram algumas evidências de que o HIV-1 teve sua origem em primatas não-humanos, provavelmente chimpanzés (GAO et al., 1999). Um vírus isolado da sub-espécie *Pan troglodytes troglodytes* (Fig.1a), e também outros vírus de chimpanzés são relacionados ao vírus HIV-1 isolado de seres humanos, e, provavelmente, o estabelecimento da infecção em humanos foi resultado da transmissão inter-espécies (GAO et al., 1999).

Quanto à origem do HIV-2, parece que o macaco da espécie *Cercocebus atys* (Fig.1b) seja o responsável por sua disseminação. Adicionalmente, o SIV (Vírus da imunodeficiência de símios), que infecta uma subespécie de chimpanzés africanos, apresenta uma similaridade genética muito estreita com o HIV, apontando para hipótese de que ambos evoluíram de uma espécie comum (WIGG; ROMANOS, 2002).

Baseado nestas hipóteses, alguns estudos sorológicos têm sugerido que o HIV passou a infectar os seres humanos entre as décadas de 1940 e 1950, corroborando os postulados de que o HIV é originário da África Central. Amostras de soro armazenadas, colhidas no início da década de 50 nesta região, foram comprovadamente positivas para a presença de anticorpos anti-HIV (BLATTNER, 1991). Já nos Estados Unidos da América do Norte, onde esta infecção foi inicialmente descrita, não foram verificados casos positivos em

amostras armazenadas, colhidas antes da década de 70 (FARHTING; BROWN; STAUGHTON, 1989; BLATTNER, 1991).



a - *Pan troglodytes troglodytes*

b - *Cercocebus atys*

Figura 1: (a) Chimpanzé espécie *Pan troglodytes troglodytes* e o (b) macaco da espécie *Cercocebus atys*, possíveis primatas não-humanos nos quais o HIV-1 e HIV-2 tiveram origem, respectivamente (Fonte: Pesquisa virtual: www.google.com.br – unitermos: *Pan troglodytes troglodytes* e *Cercocebus atys* . Acessado em 01 de Setembro de 2004).

1.2 O HIV

O HIV-1 e o HIV-2 pertencem à Família *Retroviridae*, gênero *Lentivirus* (WHITE; FENNER, 1994). O HIV é um retrovírus que produz infecção crônica no hospedeiro e gradualmente debilita seu sistema imunológico, sendo o HIV do tipo-1, predominante no gênero *Lentivirus*, que também é constituído pelo vírus da imunodeficiência de símios (SIV), além do HIV-2, (GREZ et al., 1994; BEER et al., 1999; HANN et al., 2000).

Com base em análises filogenéticas realizadas a partir dos genes *gag* e *pol*, o HIV-1 é classificado em três grupos: M (*major*), O (*outlier*) e N (*não M, não O*). No grupo “M”, está classificada a maior parte dos vírus HIV-1, havendo onze sub-tipos que são caracterizados de A até K , e que divergem entre si em torno de 30%, na região do envelope viral. O grupo “O” possui apenas um sub-tipo que representa 5% dos casos de HIV, e é encontrado nos países: Camarões, Gabão e Nova Guiné, e diverge em 50% das demais amostras do sub-grupo M. Já o sub-grupo “N”, só foi descrito na República dos Camarões (COLLIER; OXFORD, 1993; ROBERTSON et al., 2000)

Com relação à sua estrutura, o HIV-1 é um vírus esférico, com diâmetro aproximado de 80 a 130 nanômetros (nm). Sua superfície externa é composta por uma dupla camada lipídica, na qual se encontram distribuídas 72 projeções, trimeros ou tetrâmeros, de glicoproteínas do envelope denominadas de glicoproteínas 120 (gp120), as quais são responsáveis pela ligação aos receptores de membrana CD4+ da célula hospedeira. Para cada projeção com quatro gp120, existe o mesmo número de gp41 que estão encaixadas na membrana (FOLEY, 2000; STINE, 2000).

Na camada mais interna encontra-se a matriz protéica, formada pela proteína p17 e o capsídeo viral (core) formado pela proteína p24, que contém o material genético do vírus HIV-1. No interior do capsídeo viral, encontram-se as duas simples fitas de RNA, as enzimas transcriptase reversa (RT), a integrase (INT), a protease (PT), a ribonuclease H (RH) e duas outras proteínas, p6 e p7 (FAUCI, 1988; STINE, 2000) (Figura 2).

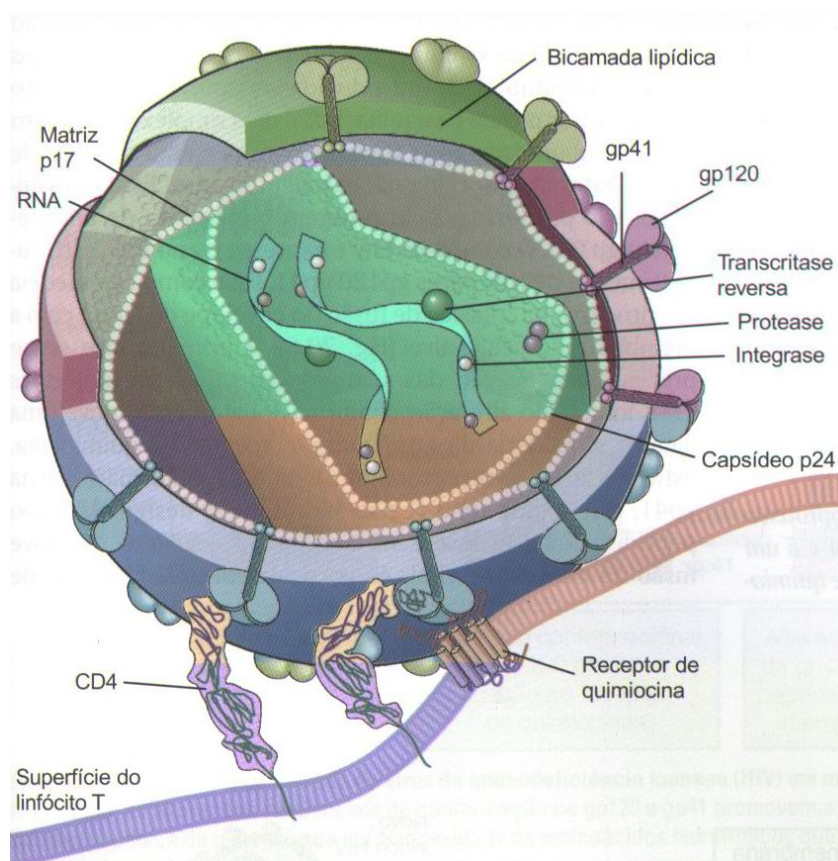


Figura 2: Estrutura do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1), ligado pela gp120 ao receptor CD4+ do linfócito T (Fonte:ABBAS, 2003).

Os retrovírus possuem alguma homologia em sua estrutura e contém os mesmos três genes, *gag*, *pol* e *env* codificando as proteínas estruturais e enzimas usadas no ciclo de replicação (FAUCI, 1988).

Em relação às duas fitas de RNA, com 9.200 pares de bases (pb) cada, elas representam o genoma do HIV e cada fita simples possui duas Longas Repetições Terminais (*LTR = Long terminal repeat*) nas suas extremidades, as quais regulam a integração do gene viral e a replicação viral: *LTR - gag, pol, vif, vpr, tat, rev, vpu, env, nef - LTR*. Os genes *gag*, *pol* e *env* são responsáveis pela codificação dos principais componentes estruturais e funcionais do vírus (BEER et al., 1999; KUIKEN et al., 2000) (Figura 3), enquanto que os demais genes, *vif*, *vpr*, *tat*, *rev*, *vpu*, *nef*, codificam proteínas que regulam o ciclo de vida do vírus (BARRE-SINOUSI et al., 1983).

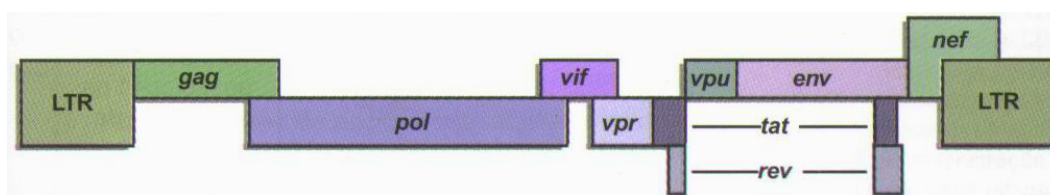


Figura 3: Estrutura genômica do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) (Fonte:ABBAS, 2003).

As *LTRs* que flanqueiam as duas simples fitas do RNA do HIV, não fazem parte do genoma do HIV, mas contém seqüências que ajudam na regulação do controle da expressão dos genes *gag - pol - env* (DIMMOCK; PRIMROSE, 1987). O gene *gag* é responsável pela codificação das proteínas do capsídio viral: a p17 (matriz), a p24 (capsídio), a p7 (nucleocapsídio) e a p6, todas estas originadas de uma proteína precursora de 55Kd, a p55, a qual é posteriormente clivada por uma protease viral no processo de montagem do vírus (FAUCI et al., 1996).

O gene *pol* codifica a transcriptase reversa (RT), protease (PT), ribonuclease (RN) e a integrase (INT), as quais são responsáveis pelo “corte” do DNA da célula hospedeira e inserção do DNA viral (GREENE, 1993). Já o

gene *env* codifica as glicoproteínas do envelope viral, a gp120 e a gp41, que são originadas de uma proteína precursora comum, a gp160. A gp41 é uma proteína transmembrana que faz a comunicação da gp120 com o exterior do HIV (STINE, 2000).

Os genes acessórios, *tat*, *rev* e *nef*, produzem os fatores regulatórios que são necessários para a expressão e replicação do HIV-1. O gene *tat* produz a proteína regulatória que aumenta a transcrição do próvirus (cDNA) HIV e o gene *rev* promove a inclusão nuclear dos RNAs virais incompletamente processados e/ou não processados, com isso, estabilizando e utilizando o RNA viral disponível (KUIKEN et al., 2000). O gene *nef* codifica a proteína que inibe a atividade da LTR, e assim, isso retarda sua replicação, favorecendo desta forma, o estabelecimento de infecções latentes (HASELTINE, 1991).

Para os demais genes, *vif*, *vpr* e *vpu*, são atribuídas funções de codificação de proteínas que estão diretamente envolvidas no papel de infectividade e patogenia do vírus (KUIKEN et al., 2000). O HIV-2 não apresenta o gene *vpu*, mas apresenta o gene *vpx* (ESSEX; KANKI, 1989), sendo o *vif* requerido para completar a transcrição reversa do RNA viral dentro do DNA viral, aumentando assim a infectividade das partículas virais, enquanto o *vpu* ajuda no brotamento do HIV na superfície externa da célula, destruindo a proteína CD4 no interior dos linfócitos CD4+, regulando de forma negativa a expressão de CD4 nas células do hospedeiro, e com isso facilitando a liberação do vírus pelas células. Por fim, o *vpr* é responsável pelo transporte do DNA viral citoplasmático para o interior do núcleo (DIMMOCK; PRIMROSE, 1987).

Sabe-se que para cada célula infectada, há entre 400.000 a 2.500.000 de cópias de RNA viral, e até 40% da síntese protéica que ocorre dentro de uma única célula pode estar relacionada à síntese e produção da proteína viral *gag*. Estes altos níveis de RNA viral, associados à grande síntese de proteínas virais também é um mecanismo que leva à morte da célula, pois possui um alto potencial de inibição e competição contra a síntese de proteínas do hospedeiro (SOMASUNDARAN; ROBINSON, 1988).

As células que expressam receptores CD4 em sua membrana, como linfócitos T CD4+, monócitos/macrófagos e células dendríticas, são os alvos do HIV (CONNOR; HO, 1994). Neste receptor CD4 é que a gp120 do HIV se

encaixa conduzindo, desta maneira, mudanças conformacionais geradas por esta ligação, o que possibilita a transferência do material genético do centro (core) viral para dentro do citoplasma da célula hospedeira. A ligação do receptor CD4 com a gp120 do HIV, porém, por si só é insuficiente para a fusão do HIV com a membrana da célula hospedeira, sendo necessária a presença de um segundo co-receptor, os chamados receptores de quimiocinas, os quais favorecem uma alteração conformacional na glicoproteína transmembrana gp41 do HIV-1, efetivando, assim, a fusão do vírus (MURDOCH; FINN, 2000).

Estes receptores de quimiocinas são polipeptídeos de 8Kd a 12Kd, e estão divididos em duas subfamílias principais, com base em seus dois resíduos de cisteína aminoterminais: as quimiocinas C-C (CCR1-CCR10), e as quimiocinas C-X-C (CXC1-CXC6) (BAGGIOLINI, 1998). Estas quimiocinas estão distribuídas em diferentes tipos celulares, como linfócitos T (linfócitos T auxiliares tipo 1 e tipo 2), monócitos, células dendríticas, neutrófilos, células B e eosinófilos (LUSTER, 1998). A heterogeneidade de células contendo os vários tipos de quimiocinas é que explica, parcialmente, a conhecida seletividade celular de diferentes cepas do HIV-1, quando de seu tropismo por células T (T-tróficas), interagindo seletivamente com CXCR4, infectando linfócitos T. E também o seu tropismo por monócitos e macrófagos (M-tróficas), onde interage preferencialmente com CCR5 (DRAGIC et al., 1996; RUIZ; CICALA; ARTHOS, 1998). A importância da presença do CCR5 na infecção pelo HIV-1 é corroborada pelo achado de que pessoas que não expressam este receptor, em decorrência de mutações genéticas, são resistentes à infecção pelo HIV (MURDOCH; FINN, 2000) (Figura 4).

A interação do HIV via proteínas do envelope viral, gp120, com os receptores CD4+ (fusina) e co-receptores CXCR4 dos linfócitos, é considerada a primeira etapa da infecção pelo HIV, e chamada de adsorção, que é seguida de uma segunda etapa, a fusão. Após a etapa de fusão, ocorre a liberação do material genético do HIV no citoplasma celular e dá-se o início das etapas de transcrição do RNA viral em DNA complementar, o qual será incorporado ao genoma da célula hospedeira, sendo então denominado de próvirus (cDNA) (FINZI; SILICIANO, 1998).

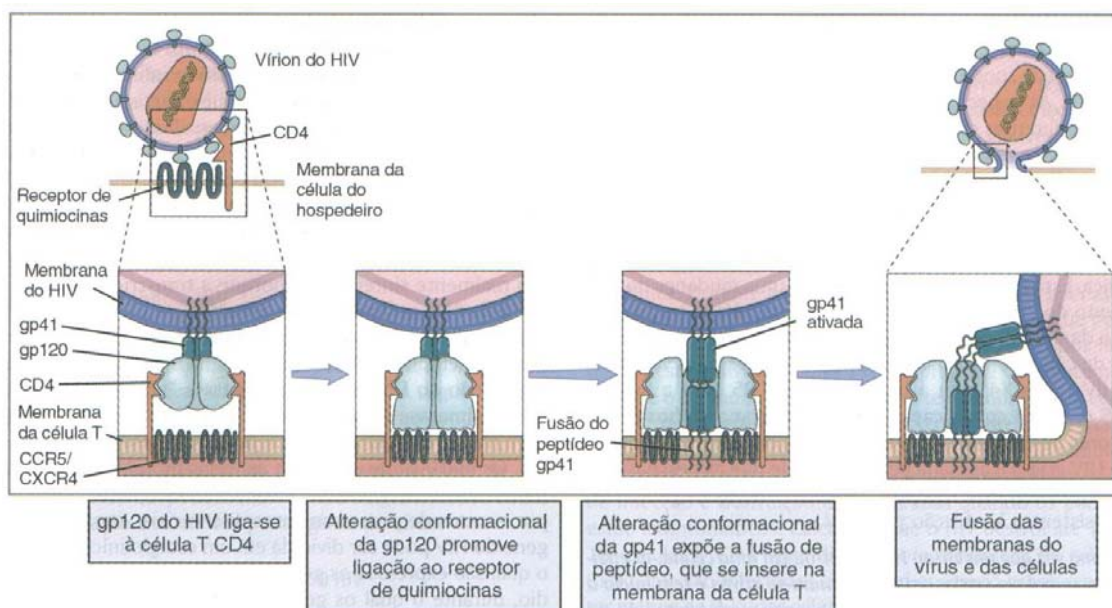


Figura 4: Mecanismo de entrada do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) em uma célula expressando o receptor CD4+ e o co-receptor CXCR4 ou CCR5 (Fonte:ABBAS, 2003).

Este processo de transcrição do RNA viral é efetuado pela enzima transcriptase reversa (TR), que também atua como ribonuclease H (RH) e irá formar no final um DNA viral de duplo filamento, o qual contém a seqüência LTR para integração no genoma viral (GREENE, 1991). Este cDNA de duplo filamento é transportado para o núcleo da célula, onde pode haver a integração ao genoma da célula através da enzima integrase, ou, simplesmente a permanência na forma circular não integrada (HASELTINE, 1991). A partir da formação deste próvirus, o mesmo somente poderá ser eliminado quando da destruição da célula pelo sistema imune, que a reconhece como material infectado, e assim desencadeia uma resposta imune mediada por células T supressoras e citotóxicas, como os linfócitos T CD4+ e CD8+ (STINE, 2000). Porém, este próvirus pode permanecer latente por tempo indeterminado, ou o mesmo ser ativado, levando assim, à síntese de novas partículas virais infectantes (ROSENBERG; FAUCI, 1991) (Figura 5).

Entre os principais estímulos que podem ativar o próvirus, temos os mitógenos, o vírus Herpes Simples (HSV), o vírus Epstein-Barr (EBV), e o vírus da hepatite B (HBV) (ROSENBERG; FAUCI, 1990). Além destes, há também

outros ativadores como as citocinas: o Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), a interleucina-1 (IL-1), a interleucina-2 (IL-2), interleucina-6 (IL-6) (ZAITSEVA, et al., 2000), e as espécies reativas de oxigênio (EROs) (PIETTE; LEGRAND-POELS, 1994; BAEUERLE; BALTIMORE, 1996).

Muitos destes fatores ativam a expressão do Fator de Transcrição Nuclear como o κ B (NF- κ B) (PIETTE; LEGRAND-POELS, 1994; SHOR-POSNER et al., 2002), que está presente no citoplasma ligado à sua proteína inibitória I- κ B. Com o estímulo ativador sobre a célula, ocorre a clivagem do complexo proteína-inibidor (NF- κ B - I- κ B), seguido da migração da proteína para o núcleo (BAEUERLE; HENKEL, 1994; BALDWIN, 1996), e com isso, o NF- κ B liga-se a seqüências específicas nas regiões promotoras dos genes-alvo, levando a transcrição do DNA proviral para o DNA da célula infectada (HASELTINE; WONG-STAAAL, 1989).

Quanto à sua transmissão, embora o HIV-1 já tenha sido detectado em diferentes fluidos biológicos, como: sangue (FRIEDLAND; KLEIN, 1987; BARRÉ-SINOUSI et al., 1983; GALLO et al., 1984; HO et al., 1984), esperma (HO et al., 1984), líquido cefalorraquiano (HO et al., 1985), secreção vaginal (WOFSEY et al., 1986), urina (LEVY et al., 1985), lágrima (FUJIKAWA et al., 1985), saliva (GROOPMAN et al., 1984; HO et al., 1985a; LAPOINTE et al., 1985) e leite materno (THIRY et al., 1985; ZIEGLER et al., 1985), ela apenas ocorre por contato sexual, inoculação com sangue ou produtos do sangue, e por transmissão perinatal (FAUCI, 1988; CDC, 1982d).

É importante chamar a atenção para o fato de que a transmissão do HIV-1 através do beijo é baixa, e torna-se importante salientar que o contato direto com objetos e vetores, desde que a pele esteja íntegra, e, o contato diário com pessoas, não transmite o vírus (STINE, 2000).

1.3 EPIDEMIOLOGIA DO HIV/AIDS

1.3.1 Epidemiologia Mundial do HIV/AIDS

Em 2004, a Joint United Nations Programme on HIV/AIDS – UNAIDS, e a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimaram que até o final do ano de 2003, aproximadamente 42 milhões de pessoas já estavam infectadas pelo

vírus HIV em todo o mundo, demonstrando um crescimento desta epidemia em relação aos 35 milhões de casos estimados no ano de 2001. Os dados estatísticos também mostram que o número de adultos com 15 anos ou mais, infectados pelo HIV é de 39,5 milhões, sendo que o número de mulheres infectadas está próximo de 18 milhões. Já os casos em crianças infectadas com até 14 anos, alcançam 2,5 milhões (UNAIDS, 2004).

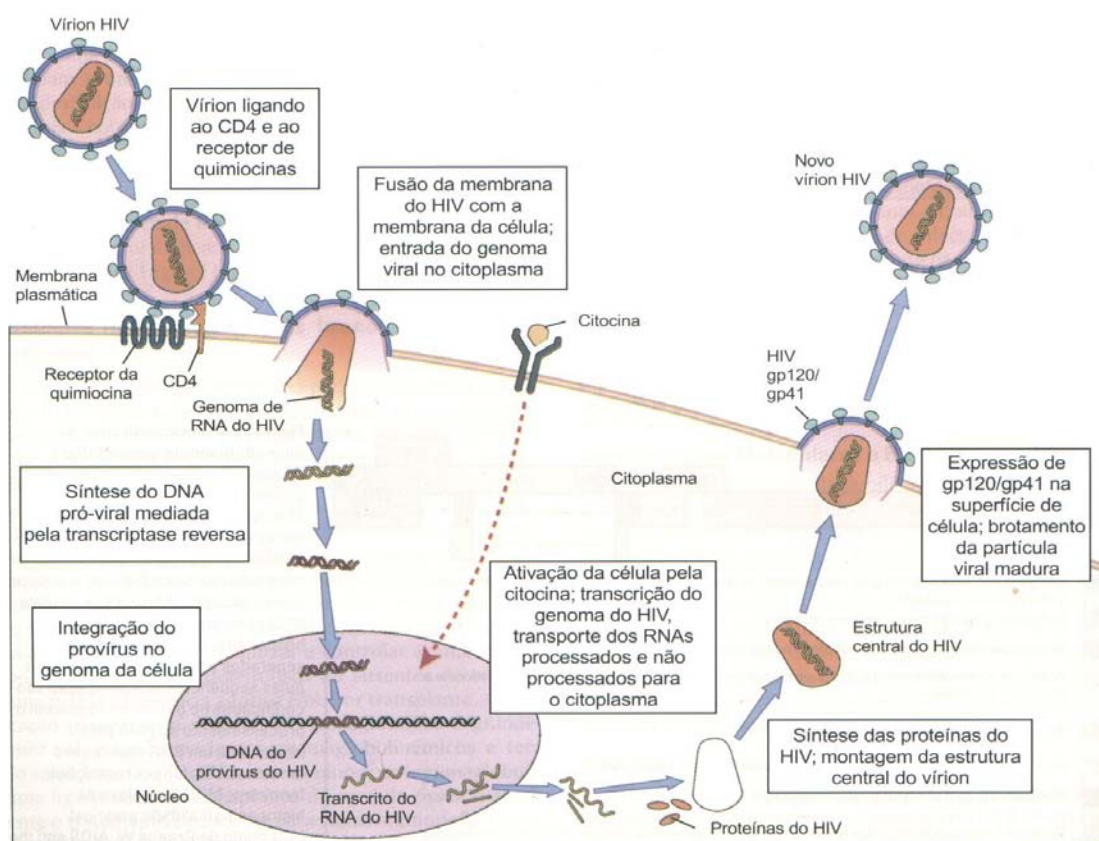


Figura 5: Ciclo de Replicação Viral do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) (*Fonte:ABBAS, 2003*).

Salienta-se que somente no ano de 2003, perto de 5 milhões de pessoas infectaram-se com o HIV, sendo o maior número de novos casos em um único ano desde o início da epidemia em 1981, e neste mesmo ano, calcula-se que a AIDS tenha causado a morte de 3 milhões de pessoas, alcançando assim, um

número de 20 milhões de óbitos pela AIDS nestas duas décadas (UNAIDS, 2004).

Dentro de uma estimativa global, o continente africano, mais especificamente a África Sub-Sahariana, sofre uma verdadeira pandemia da infecção pelo HIV com 28 milhões de casos, que somados às demais regiões deste continente, aproxima-se de 30 milhões de infectados, registrando ainda, algo em torno de 3 milhões de mortes por AIDS. Para a América Latina calcula-se 1,6 milhões de casos, América do Norte com aproximadamente 1 milhão de casos e para a região do Caribe 450 mil casos (CDC, 2004)..

1.3.2 Epidemiologia do HIV/AIDS no Brasil

Para o Brasil, a UNAIDS estima que aproximadamente 660 mil pessoas estejam infectadas pelo HIV, podendo este número ser superior a um milhão de casos (UNAIDS, 2004).

A Coordenação Nacional de DST/AIDS do Ministério da Saúde do Brasil, diagnosticou de 1980 até 31/12/2003, 310310 casos de AIDS, e o número de óbitos chega a 149723. As Regiões mais afetadas são a Sul e a Sudeste, que concentram 84,8% do total de casos de AIDS. Apenas no ano de 2003, no Brasil, foram diagnosticados 9.762 novos casos de AIDS, perfazendo uma taxa de incidência de 5,5/100.000 habitantes (BRASIL, 2004a).

As taxas de incidência por 100.000 hab. em todas as regiões, neste mesmo ano são: de 8,5 para a Região Sul; 7,5 para o Sudeste; 3,5 para o Centro - Oeste; 2,3 para o Nordeste e 2,5 para a Região Norte, ressaltando que os dados são preliminares*, considerando atrasos de notificações (BRASIL, 2004).

Dentre os 100 municípios no país com maior número de casos de AIDS, mais de 80 deles se concentram na região Sul e Sudeste, e o Estado de Santa Catarina participa com 6 municípios neste particular.

Mais especificamente, no Estado de Santa Catarina teve o seu primeiro registro em 1984, na região Oeste (BRASIL, 2000), e o último Boletim do Ministério da Saúde revelou que o número de casos notificados são de 12866 casos. Entre os 100 municípios com maior incidência (por 100000 hab.), tomando por base os dados de 2002, observa-se que o município de Itajaí (SC) possui a maior incidência do País 93,5/100.000 hab (BRASIL 2004). Outras

*Os dados relativos ao ano de 2003 são preliminares, considerando-se o atraso da notificação e as dificuldades de implantação do SINAI Windows. Toma-se o ano de 2002 como referência para análise de incidência. *Fonte:MS/SVS/PN-DST e AIDS/SINAN.*

idades de Santa Catarina que estão entre os 100 municípios brasileiros com maiores índices são: Balneário Camboriú que está na terceira posição com 78,9, a cidade de Criciúma com 52,5, e a capital Florianópolis com 45,1, sétima e décima posições, respectivamente (BRASIL, 2004).

1.4 DIAGNÓSTICO E ESTADIAMENTO DA INFECÇÃO PELO HIV

O diagnóstico laboratorial da infecção pelo HIV-1 em adultos e adolescentes, segue critérios estabelecidos pelo CDC (1999), e obedece os seguintes parâmetros:

- Resultados positivos em dois testes sorológicos tipo ELISA com princípios metodológicos distintos, seguidos de resultado positivo em teste sorológico de caráter confirmatório, tipo imunofluorescência indireta (IFI) ou Western Blot, ou:
- Resultado positivo ou qualquer quantidade detectável em um dos seguintes testes virológicos:
 - Detecção de ácido nucléico (RNA) do HIV-1, por metodologias baseadas em PCR;
 - Teste para o antígeno p24;
 - Isolamento do HIV-1 por cultura viral (CDC, 1999).

Os critérios de diagnóstico acima definidos foram usados no Brasil até o final de 2002, quando, em janeiro de 2003, o Ministério da Saúde estabeleceu novos critérios para diagnóstico da infecção pelo HIV-1 em indivíduos acima de dois anos de idade. Estes novos critérios estão apresentados num fluxograma (ver anexo 1) e agrupados em 3 etapas diferentes:

Etapa I – Triagem sorológica:

- Nesta etapa, qualquer amostra de soro ou plasma passará por um teste de imunoensaio, porém este não poderá ser de avaliação rápida (teste rápido para HIV), e deverá ser capaz de detectar nas amostras em análise, anticorpos anti-HIV-1 e anti-HIV-2;
- Todas as amostras não-reagentes terão seu resultado definido e liberado como “ Amostra negativa para o HIV”;

- Para todas as amostras reagentes ou inconclusivas, deverá ser realizado um segundo imunoensaio em paralelo ao teste de imunofluorescência Indireta (IFI) para o HIV-1, ou ao teste de Imunoblot para o HIV. Este segundo imunoensaio deverá ter um princípio metodológico e/ou antígenos distintos do primeiro imunoensaio utilizado. O teste de Western blot pode ser realizado diretamente, substituindo o método IFI.

Etapa II – Segundo ensaio confirmatório:

- A confirmação sorológica deverá ser realizada por um segundo imunoensaio em paralelo ao teste de imunofluorescência indireta para o HIV-1 (IFI/HIV-1), ou ao teste de imunoblot para o HIV.

Etapa III – Confirmação por método Blot:

- A confirmação sorológica é realizada por meio do teste de Western blot para o HIV-1 (WB/HIV-1).

O diagnóstico laboratorial confirmatório de infecção pelo HIV é acompanhado por critérios clínicos, que são usados no estadiamento e definição de caso de AIDS. Estes critérios definem a doença HIV/AIDS em adultos e adolescentes com mais de 13 anos de idade, os quais foram estabelecidos pelo CDC, e baseiam-se na contagem de linfócitos CD4+ menor que 200 células/ μ L no sangue e/ou infecção pelo HIV, associado à presença de 25 condições indicadoras de AIDS, tais como sarcoma de Kaposi, pneumonia por *Pneumocystis carinii*, ou complexo *Mycobacterium avium* disseminado (MAC).

Este sistema de classificação da infecção pelo HIV foi revisado pelo CDC em 1992, permanecendo a contagem de linfócitos CD4+ como um marcador para imunodeficiência decorrente da infecção pelo HIV, e estabelece sub-grupos em que o espectro das condições clínicas é integrado com a contagem de linfócitos CD4+. As modificações introduzidas por esta revisão tiveram como objetivo simplificar a classificação da infecção pelo HIV, refletir o padrão de acompanhamento médico dos indivíduos infectados, bem como categorizar de forma mais precisa a morbidade relacionada ao HIV. O sistema é baseado em

três ordens de contagens de linfócitos CD4 e três categorias clínicas, sendo representado por uma matriz constituída de nove categorias, conforme se verifica na tabela 1 (CDC, 1992).

O diagnóstico de AIDS é definido para todos os pacientes da Categoria clínica “C”, como também os que se enquadram no sub-tipo 3 (A3,B3 e C3) (CD4+ <200 céls/ μ L) (CDC, 1992)

Quadro 1. Classificação da infecção pelo HIV, proposta pelo CDC e utilizada a partir de 1993.

Contagem de linfócito CD4	Categorias Clínicas		
	A	B	C
$\geq 500/\mu\text{L}$	A1	B1	C1
200 - 499/ μL	A2	B2	C2
< 200/ μL	A3	B3	C3

- **Categoria clínica “A”**

Neste grupo, estão aqueles pacientes soropositivos para o HIV-1, e que apresentam uma ou mais das seguintes condições (CDC, 1992):

- infecção assintomática;
- linfadenopatia generalizada persistente;
- infecção sintomática aguda (síndrome retroviral);

- **Categoria clínica “B”**

Neste, enquadram-se todos os pacientes sintomáticos que apresentam uma ou mais das seguintes condições (CDC,1992):

- candidíase orofaríngea persistente;
- sintomas constitucionais como febre ($>38,5^{\circ}$ C) ou diarreia por mais de 1 mês;
- púrpura trombocitopênica idiopática;
- listeriose;
- neuropatia periférica.

- **Categoria clínica “C”**

Neste último grupo, se enquadram todos os pacientes que uma vez classificados nesta categoria, assim se manterão. Suas principais condições clínicas são:

- perda de peso, sem motivo aparente, superior a 10% do peso corporal, em consequência de diarreia por 30 dias ou mais;
- enfraquecimento crônico;
- pneumonia recorrente;
- candidíase traqueal, bronquial ou pulmonar;
- câncer cervical invasivo;
- coccidioomicose disseminada ou extra-pulmonar;
- criptosporidiose e/ou isosporidiose intestinal crônica;
- criptococose extrapulmonar;
- encefalopatia relacionada ao HIV-1;
- sarcoma de Kaposi;
- tuberculose pulmonar e extra-pulmonar;
- septicemia recorrente por *Salmonella*.
- linfoma imunoblástico;
- linfoma cerebral;
- leucoencefalopatia multifocal progressiva.

Ainda neste grupo estão relacionadas outras infecções concomitantes por outras viroses (CDC,1992).

1.5 EVOLUÇÃO DA INFECÇÃO PELO HIV

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

Os sinais e sintomas da síndrome retroviral aguda começam entre a 2ª e 6ª semanas depois da exposição ao vírus, acometendo 50 a 90% dos pacientes infectados (QUINN, 1996), e caracteriza-se por febre, astenia, cefaléia, fotofobia, mialgia, adenopatia, faringite, artralgia, rash cutâneo maculopapular eritematoso, perda de peso, náuseas e vômito. Também pode

apresentar candidíase oral, neuropatia periférica, meningoencefalia asséptica e síndrome de Guillain-Barré (QUINN, 1997; AIDS, 2004). Estas características clínicas refletem o estado de intensa replicação viral do HIV-1, onde as concentrações plasmáticas alcançam índices superiores a 50000 cópias/mL de partículas virais, e este quadro é acompanhado por depleção do número de linfócitos CD4+ (LULIANO et al., 1997; SPADA; TREITINGER; HOSHIKAWA-FUGIMURA, 1998; YOUNG; KURITZKES, 1999) (Figura 6).

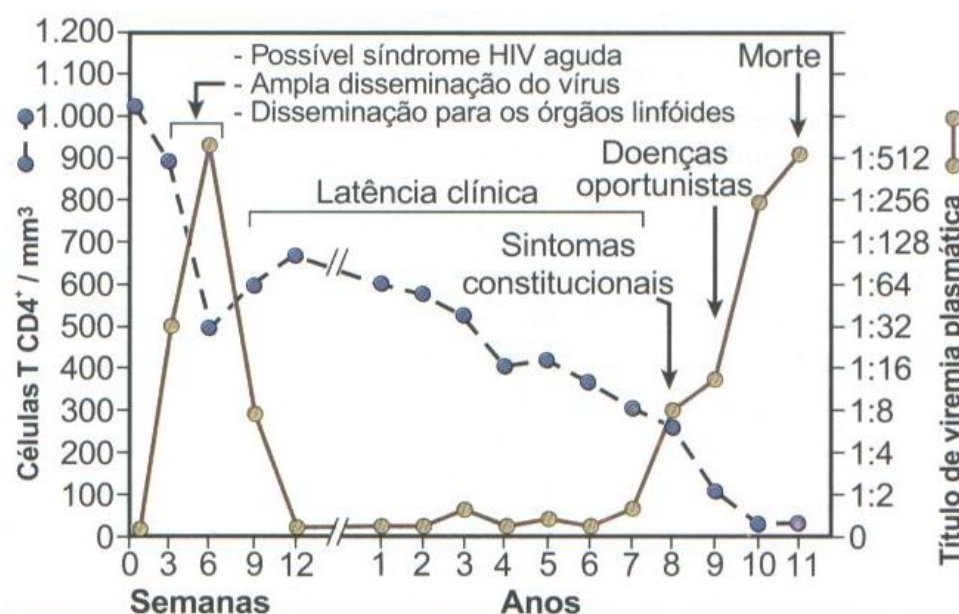


Figura 6: Evolução clínica dos indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1), caracterizando as fases de transmissão, síndrome retroviral aguda, soroconversão, latência clínica e fase sintomática, AIDS e morte (*Fonte: ABBAS, 2003*).

Observa-se que durante esta fase aguda também ocorre um aumento do número absoluto de linfócitos CD8+ circulantes, os chamados linfócitos T citotóxicos (CTL), com uma inversão da relação CD4/CD8, que se torna menor que um.

Após um período de três semanas a três meses do aparecimento dos sinais e sintomas, ocorre uma parcial recuperação do sistema imune que é marcada pela diminuição da viremia, seguido de um aumento no número de linfócitos CD4+ e soroconversão, com anticorpos anti-HIV-1 detectáveis nos ensaios do tipo ELISA. Todavia, esta resposta do sistema imune à infecção

pelo HIV-1 é insuficiente, e não ocorre bloqueio total da replicação viral, que se mantém ativa nos linfonodos. O período que se segue é o de latência clínica e pode durar de 2 a 10 anos até o advento da síndrome de imunodeficiência, a AIDS (QUINN, 1997) (Figura 7).

A AIDS que ocorre após a fase crônica, é marcada por uma progressiva destruição dos linfócitos CD4+ (GOUGEON; MONTAGNIER, 1999), a qual é acompanhada por um aumento dos níveis de RNA do HIV-1 no plasma (ALTFELD et al., 2001).

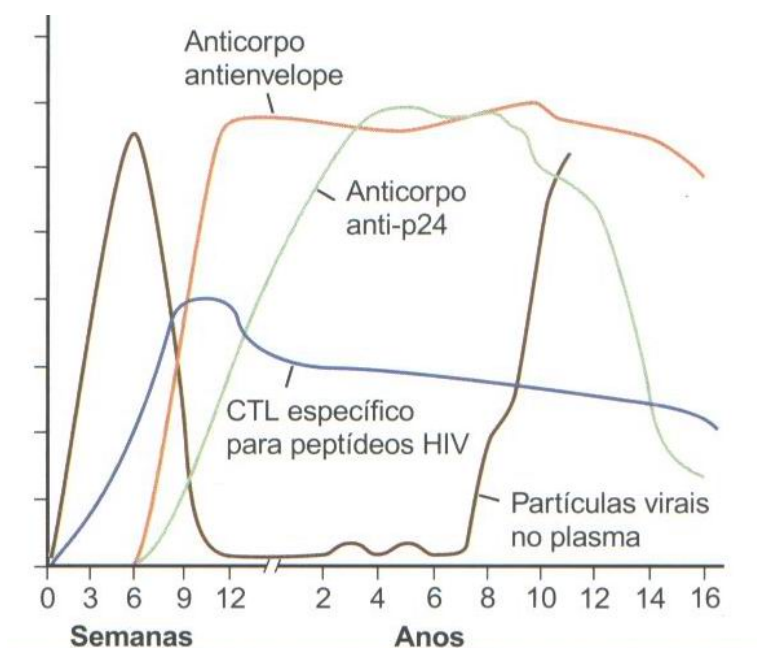


Figura 7: Evolução temporal da resposta imunológica em indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) (Fonte:ABBAS, 2003).

Todas estas alterações nos níveis plasmáticos de RNA do HIV-1, e no número de linfócitos CD4+, são seguidas concomitantemente por um aumento da morte programada das células (apoptose) em linfócitos infectados e não infectados pelo HIV (BADLEY et al., 2000), como também por alterações significativas na produção e/ou ativação de citocinas pró e anti-inflamatórias, com um impacto direto na replicação viral, caracterizando o extenso grau de alterações que ocorre no sistema imune do hospedeiro (POLI; PANTALEO; FAUCI, 1993).

O conhecimento sobre o ciclo de replicação viral do HIV-1, que tornou possível a identificação de várias etapas deste processo, abriu algumas janelas para a intervenção terapêutica, com fármacos antirretrovirais que podem agir sobre as suas várias fases da replicação viral. O principal objetivo da terapia antirretroviral 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 (CARPENTER et al., 1997).

O Ministério da Saúde até o final do ano de 2003, recomendava que a terapia antirretroviral deveria ser iniciada em todos aqueles pacientes que apresentassem contagem de linfócitos CD4+ menor que 350 células/mm³, sendo que o esquema terapêutico inicial deveria ser composto por, pelo menos, dois inibidores da transcriptase reversa, análogo de nucleosídeo (ITRN), podendo-se associar um inibidor da transcriptase reversa não análogo de nucleosídeo (ITRNN), ou, um inibidor de protease viral (IP), em situações especiais. Entretanto, em pacientes que apresentassem contagem de linfócitos CD4+ entre 350 e 500 células/mm³, o início da terapia com esquema terapêutico duplo ou triplo, poderia ser considerado, mesmo que a carga viral fosse inferior a 30000 cópias/mL, ressaltando que o início da terapia antirretroviral, recomendado pelo Ministério da Saúde não deveria levar em conta apenas uma única avaliação do número de linfócitos CD4+ e de carga viral (BRASIL, 2000).

Em outubro de 2003, o Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST) e Aids do Ministério da Saúde reuniu o Comitê Assessor para Terapia Antirretroviral de Adultos e Adolescentes, com o objetivo de discutir os recentes avanços na área e assistir o Programa na revisão das estratégias para o tratamento da infecção pelo (HIV) em adultos e adolescentes. Assim, em relação às recomendações anteriores, foram mantidos os critérios para início de tratamento e as definições de esquemas preferenciais e alternativos, com sugestões de fármacos de primeira e segunda linha (Quadro 1 e 2). Em conseqüência, o tratamento antirretroviral agora é recomendado para todos os pacientes infectados pelo HIV que sejam sintomáticos, independentemente da contagem de linfócitos CD4+, e para aqueles assintomáticos com contagem de linfócitos CD4+ abaixo de 200 células/mm³. Todavia, quando o paciente assintomático apresenta contagem

Quadro 2. Recomendações para início da terapia antirretroviral em adultos e adolescentes infectados pelo HIV - 2004.

Quadro Clínico-Laboratorial	Decisão
Assintomáticos sem contagem de linfócitos T-CD4+ disponível	Não tratar
Assintomáticos com CD4 > 350 células/mm ³	Não tratar
Assintomáticos com CD4 entre 200 e 350 células/mm ³	Considerar tratamento
Assintomáticos com CD4 <200 células/mm ³	Tratar + quimioprofilaxia para IO
Sintomáticos	Tratar + quimioprofilaxia para IO

IO = infecção oportunista

Quadro 3. Esquema da terapia Antirretroviral recomendada para adultos e adolescentes infectados pelo HIV - 2004.

Esquema terapêutico	Combinações de fármacos
2 ITRN	Zidovudina + Didanosina Estavudina + Didanosina
3 ITRN	Zidovudina + Lamivudina + Abacavir
2 ITRN + 1 ITRNN	Zidovudina + Didanosina + Efavirenz ou Nevirapina Estavudina + Didanosina + Efavirenz ou Nevirapina Estavudina + Lamivudina + Efavirenz ou Nevirapina
2 ITRN + 1 IP	Zidovudina + Didanosina + Indinavir ou Nelfinavir ou Ritonavir Zidovudina + Lamivudina + Indinavir ou Nelfinavir ou Ritonavir Estavudina + Didanosina + Indinavir ou Nelfinavir ou Ritonavir Estavudina + Lamivudina + Indinavir ou Nelfinavir ou Ritonavir
2 ITRN + 2 IP	Zidovudina + Didanosina + Indinavir + Ritonavir Zidovudina + Lamivudina + Indinavir + Ritonavir Estavudina + Didanosina + Indinavir + Ritonavir Estavudina + Lamivudina + Indinavir + Ritonavir

de linfócitos CD4+ entre 200 e 350 células/mm³, o início da terapia antirretroviral pode ser considerado de acordo com a evolução dos parâmetros imunológicos (contagem de linfócitos CD4+) e virológicos (carga viral), e com outras características do paciente (motivação, capacidade de

adesão, co-morbidades). Dentro dessa faixa, a monitorização clínico-laboratorial e a reavaliação da necessidade do início da terapia antirretroviral devem ser mais freqüentes, já que a queda dos linfócitos CD4+ para menos de 200 células/mm³ é indesejável, por estar associada a um aumento na incidência de infecções oportunistas e a resposta terapêutica menos duradoura (Quadro 3) (BRASIL, 2004b).

1.6 IMUNIDADE CELULAR

A imunidade celular possui a capacidade de ser específica contra diferentes organismos e é uma função dos linfócitos, mas a função de morte e eliminação de microrganismos por fagocitose é realizada por macrófagos e outras células do hospedeiro (ISMAIL et al., 2002).

Assim, os linfócitos T que possuem a proteína CD4+ em sua membrana reconhecem antígenos apresentados no contexto de moléculas da classe II do complexo principal de histocompatibilidade (MHC-II). Subsequentemente, estes linfócitos CD4+ tornam-se ativados e diferenciam-se dentro de dois grupos funcionais, denominados de linfócitos T auxiliares tipo 1 (Th-1) e linfócitos T auxiliares tipo 2 (T helper -2) (SZABO et al., 1997).

As células Th-1, através da produção e secreção de IFN- γ e ligação a moléculas CD40 presentes na superfície de macrófagos, via interação CD40 e seu ligante CD40L, ativam fagócitos, resultando em um aumento da atividade microbicida destas células e eliminação dos microrganismos fagocitados. A indução de Th-1 é dependente de IL-2, a qual é produzida por células apresentadoras de antígenos (APC) como macrófagos ativados e células dendríticas, e assim, após exposição ao patógeno inicia-se a resposta imune celular (XU et al., 1998).

Além de ativar os macrófagos, os linfócitos CD4+ são essenciais para a ativação de linfócitos CD8+ e geração de células T citotóxicas (CTL). Similar atuação ocorre na diferenciação de células B antígeno-específicas, com a produção de anticorpos que requerem sinais de co-estimulação e citocinas provenientes dos linfócitos CD4+ (ISMAIL et al., 2002).

Os linfócitos CD8+ são um dos maiores componentes da imunidade celular e possuem papel-chave na eliminação de células infectadas por vírus e tumores (FLAMAND et al., 1998; KALAMS; WALKER, 1998). Estes linfócitos

CD8+ medeiam sua toxicidade através de duas vias maiores, a via citotóxica dependente de perforina e a via dependente de Fas (BOSSI; GRIFFITHS, 1999). A perforina é uma proteína de 70Kd contida nos grânulos líticos, a qual forma poros na membrana da célula-alvo, facilitando a entrada de granzimas, as quais ativam a cascata apoptótica, resultando na morte das células (GAMANDIA et al., 2001; CHEN et al., 2001).

A outra via de citotoxicidade das células CD8+ é mediada através da via Fas/FasL. A FasL (CD95L) (Fas ligante) está presente na superfície de linfócitos CD8+, dentro de grânulos líticos, e liga-se a receptores de morte tipo Fas (CD95) na superfície da célula-alvo, o que induz a morte programada da célula (apoptose) (BOSSI; GRIFFITHS, 1999).

Os estudos realizados em pacientes soropositivos para o HIV-1 abordando o impacto da infecção sobre a depleção de linfócitos CD8+ e reconstrução da resposta imune, indicam que a replicação do HIV e os níveis de viremia plasmática, são controlados por linfócitos CD8+ específicos para o HIV-1 (ROSENBERG et al., 1997; BRODIE et al., 1999). Com isso, verifica-se que há correlação entre a resposta específica mediada por linfócitos CD4+, linfócitos CD8+ e carga viral, indicando que células Th possuem um papel fundamental no controle da imunidade para o HIV-1 (ROSENBERG et al., 1997).

Todas estas alterações na imunidade celular, caracterizadas por alterações quantitativas e funcionais de linfócitos T, e também pela hiperatividade de linfócitos B, são observadas tanto em pacientes com AIDS como aqueles pacientes infectados pelo HIV-1, que ainda não apresentam imunodeficiência (FAUCI et al., 1996). Em particular, estas alterações podem ser demonstradas através da produção e ativação de um diferente número de citocinas, que claramente sofrem um desequilíbrio nos pacientes infectados pelo HIV e/ou acometidos pela AIDS (POLI, 1999; BREEN, 2002).

1.7 IMUNIDADE HUMORAL

Em pacientes infectados pelo HIV-1, a hipergamaglobulinemia e a espontânea secreção de níveis elevados de imunoglobulinas (Ig's) por linfócitos B periféricos, são achados marcantes e precoces que indicam o

comprometimento funcional dessas células em estágios iniciais da infecção (DE MILITO et al., 2001; NAGASE et al., 2001).

Esta característica hiperatividade de linfócitos B, não impede que ocorra um grave comprometimento na formação de anticorpos antígeno-específicos nesses pacientes, seja após vacinação ou após estimulação *in vitro*, com mitógenos e antígenos (DE MILITO et al., 2001; NAGASE et al., 2001).

Os mecanismos que estão envolvidos na hipergamaglobulinemia ainda são pouco conhecidos, e estudos sugerem a participação de proteínas virais (Tat, Nef, gp 120), como também distúrbios no sistema imune envolvendo linfócitos B e linfócitos T, e a secreção de citocinas (TNF- α , IL-6 e IL-10) (MÜLLER; AUKRUST; FROLAND, 1998; NAGASE et al, 2001).

Os estudos recentes têm apontado uma alteração na cinética celular dos linfócitos B em pacientes infectados com o HIV, com plasmocitose e marcante diminuição dos linfócitos B de memória (DE MILITO et al., 2001; NAGASE et al., 2001).

Os linfócitos B de memória expressam caracteristicamente CD27, uma glicoproteína transmembrana tipo I da família dos receptores do fator de necrose tumoral (TNF-R), que, quando interage com seu ligante natural CD70 (CD27L), expresso em linfócitos T ativados, promove a diferenciação dos linfócitos B de memória em plasmócitos (NAGASE, 2001). Na infecção pelo HIV, observa-se um aumento na expressão de CD70 pelos linfócitos T, sendo este aumento inversamente correlacionado com a proporção de linfócitos B de memória (CD27+) circulante (DE MILITO et al., 2001).

Outra observação relevante na infecção pelo HIV é a diminuição de CD154 (CD40L), uma molécula co-estimuladora expressa em linfócitos CD4+. A interação de CD40L com CD40 dos linfócitos B é requerida para inversão de classes das imunoglobulinas, promovendo a geração de linfócitos B de memória (CD27+). Com base nesses achados, a hipergamaglobulinemia, assim como o comprometimento na secreção de anticorpos antígeno-específico, seria decorrente de ambos os mecanismos, aumento de CD70, que leva à plasmocitose, e secreção de grandes níveis de imunoglobulinas, porém com depleção dos linfócitos B de memória (CD27+). Ocorre também diminuição

de CD40L, resultado da depleção de linfócitos CD4+ característico da infecção pelo HIV, o que acaba por comprometer a manutenção de um *pool* normal de linfócitos B de memória requerido na resposta secundária, ou seja, antígeno-específica (NAGASE et al., 2001).

A hiperatividade persistente dos linfócitos B, durante a infecção pelo HIV, acaba por favorecer transformações genéticas que levam ao aparecimento de clones anômalos (HERNDIER; KAPLAN; McGRATH, 1994; RIBOLDI et al., 1994), o que poderia explicar, ao menos em parte, a alta incidência de linfoma não-Hodgkin nesses pacientes (HERNDIER; KAPLAN; McGRATH, 1994,).

O efeito da terapia antirretroviral combinada sobre a hipergamaglobulinemia na infecção pelo HIV vem recebendo especial atenção nos últimos anos. Notermans et al. (2001) evidenciaram um significativo declínio nos níveis séricos de IgG após o início da terapia antirretroviral, contudo, a normalização a valores abaixo do limite superior de referência, não foram verificados na maioria dos pacientes estudados. Corroborando estes achados, Jacobson et al. (2002), comparando pacientes tratados e não-tratados com terapia antirretroviral combinada, observaram também uma diminuição significativa de IgG sérica, sendo que metade destes pacientes manteve níveis de IgG acima dos valores de referência.

1.8 APOPTOSE

Descrita pela primeira vez em 1972 por Currie e colaboradores, como sendo um mecanismo fisiológico de morte celular programada em tecidos e células, a apoptose é caracterizada morfológicamente por condensação da cromatina, fragmentação nuclear, vacuolização citoplasmática e clivagem do DNA, processo este que é seguido por engolfamento dos corpos por células adjacentes (HENGARTNER, 2000; 1998; KRAMMER, 2000).

Todavia, este mecanismo de morte celular é distinto da necrose celular e tecidual, e as diferenças existentes entre estes dois processos estão baseadas na morfologia e na propensão das células necróticas para induzir uma resposta inflamatória, efeito este que não é gerado pelo mecanismo de apoptose (DAUGAS et al., 2000).

A apoptose é um mecanismo fisiológico que preserva a homeostasia celular de tecidos normais, sendo essencial no sistema imune para o desenvolvimento e seleção natural, gerando e mantendo os mecanismos de auto-tolerância, além de ser o principal mecanismo de controle da homeostasia celular após expansão clonal reativa a uma injúria (DOBMEYER et al., 1997; ECONOMIDES et al., 1998; KRAMMER, 2000).

Em relação ao seu controle, a apoptose é regulada por fatores internos e externos (NAGATA, 1997) e consiste de três estágios sucessivos: (i) a recepção de sinais intra e extracelulares que iniciam a morte; (ii) a morte das células por ativação de proteases intracelulares; e (iii) a remoção das células mortas por células fagocíticas (VAUX; STRASSER, 1996).

Os estímulos que iniciam a apoptose estão geralmente associados à ativação de caspases, um grupo de proteases específicas, sintetizadas como zimógenos inativos, e que são ativadas após remoção proteolítica de um pró-domínio terminal (COHEN, 1999). As caspases também servem como moléculas ligantes que iniciam a morte celular ou, quando ativadas de maneira maciça, podem mediar a degradação da estrutura essencial e regulatória das proteínas, culminando na ativação da DNase ativada por caspases (CAD), uma enzima responsável pela fragmentação oligonucleossomal do DNA (BUDIJARDO et al., 1999; NAGATA, 1997).

A ativação do mecanismo da apoptose pode ocorrer por duas vias, uma denominada extrínseca, e outra denominada intrínseca (ESTAQUIER et al., 2003). A via extrínseca ocorre quando quatro tipos de receptores celulares: o receptor Fas (CD95) (SCARFFIDI et al., 1998), o receptor do Fator de Necrose tumoral, p55 (TNF-R) (DARMAY; AGGARRWAL, 1997), e os receptores tipo 1 e 2 (TRAIL/APO-2L), ligantes indutores de apoptose relacionados ao TNF (WILEY et al., 1995), fixam-se aos seus ligantes: FasL (CD95L), TNF e TRAIL/APO-2L, respectivamente. Esta ligação entre ligantes de morte aos receptores de morte, como assim são chamados, levam à formação de um complexo de sinalização indutor de morte (DISC), que compreende as proteínas adaptadoras: FADD – Fas associado ao domínio de morte, TRADD – TNF-R associado ao domínio de morte e a procaspase-8, resultando na ativação da caspase-8. A caspase-8 ativa a enzima efetora da caspase-3 ou cliva a proteína Bid, uma proteína da família de proteínas pró-apópticas Bcl-2,

gerando uma *tBid* (*truncated Bid*). A *tBid* transloca-se até a mitocôndria onde atua junto com as proteínas Bax e Bak, ambas pertencentes também à família de proteínas Bcl-2 (CHINNAIYAN et al., 1995; HENGARTNER, 2000).

Já a via mitocondrial, intrínseca, é induzida por fármacos, luz ultra-violeta, etc. Em ambas as vias, o envolvimento da mitocôndria é manifestado pela liberação do *citocromo c* do citosol, onde este é associado com o fator de ativação de proteases pró-apópticas (Apaf-1) (LUO et al., 1998) e a pró-caspase-9 para formar o apoptossoma. O apoptossoma ativa a caspase-9, que por sua vez, ativa a caspase-3, que é responsável pela degradação das proteínas celulares e nucleares, e pela ativação da DNase ativadora de caspases (CAD) (SAIKUMAR et al., 1999). Contudo, outros fatores que atuam no núcleo da célula são liberados pela mitocôndria, como a Endo G que gera a fragmentação do DNA oligonucleossomal na presença de caspases inibitórias quando transloca-se para o núcleo, e o fator indutor de apoptose (AIF), que induz a condensação da cromatina e a fragmentação do DNA de alto peso molecular (50 Kbp) (ESTAQUIER et al., 2003). Igualmente, outras proteínas adaptadoras como FLASH (*Caspase-associated huge protein*), que interage com os domínios efetores de morte (DED) da caspase 8 (IMAI et al., 1999), proteínas inibidoras como a FLIP (*FLICE inhibitory protein*) e proteínas envolvidas em mecanismos de sobrevivência, como a proteína denominada RIP, podem participar deste complexo mecanismo que determina a vida ou a morte celular (SAIKUMAR et al., 1999)

Entretanto, diante deste complexo mecanismo, a via Fas (CD95) e FasL (CD95L) é considerada a principal via indutora de apoptose (KRAMMER, 2000). A ativação dos linfócitos em resposta a estímulos, propicia a expressão de FasL, e sua interação com Fas leva à transdução do sinal apóptico sobre os domínios de morte, de maneira análoga à observada após interação de TNF- α com seu receptor tipo 1 (TNF-R1, conforme visto anteriormente) (KRAMMER, 2000).

Exceto o fato de o mecanismo de apoptose ser um processo fisiológico de eliminação de células imunes ativadas, a mesma pode ter ação deletéria naqueles pacientes infectados pelo HIV-1, que são acometidos por um estado crônico de ativação do sistema imune, onde o estímulo antigênico viral não

cessa, mantendo principalmente os linfócitos ativados e sensíveis à apoptose (GOUGEON; MONTAGNIER, 1999).

Com isso, e baseado em alguns estudos, é aceita a hipótese de que a depleção dos linfócitos CD4+, que resulta na imunodeficiência e aumento da susceptibilidade às infecções oportunistas em pacientes infectados pelo HIV-1, é resultado em parte, do aumento da apoptose que ocorre tanto em células infectadas, como também naquelas não infectadas pelo HIV (MEYAARD, 1992; GOUGEON; MONTAGNIER, 1993).

O fato da apoptose ocorrer numa pequena proporção de linfócitos infectados pelo HIV-1, indica que o aumento da apoptose observada em pacientes infectados, resulta de mecanismos distintos da ação direta do HIV (BADLEY et al., 2000).

Outro mecanismo pró-apóptico envolvido, é a ação das próprias proteínas do HIV-1, como a proteína *tat* (LI et al., 1995; GOUGEON; MONTAGNIER, 1999), a *vpr* (STEWART, 1999; JACOTOT, 2000) e, talvez o mais importante, a via de interação entre o complexo glicoproteína gp120/gp41 do envelope (*env*) com os receptores CD4+ e os co-receptores de quimiocinas (ex.: CXCR4, CCR5) (LIFSON et al., 1986; CHIRMULE; PAHWA, 1996). O gene *tat* gera um produto indutor de apoptose sensibilizando as células à apoptose, com auxílio de um segundo sinal dado pelo receptor de células T (TCR), CD4+ ou Fas (CD95) (GOUGEON; MONTAGNIER, 1999). Após sua entrada na célula não infectada, o gene *tat* atua diminuindo a atividade de uma enzima envolvida em processos de oxidação intracelular, a superóxido dismutase (SOD), gerando uma depleção de glutathiona (GSH), o que resulta no aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs), e, com isso, geração de um processo pró-oxidativo intracelular (KRAMMER, 2000). A proteína *vpr*, além de estar ligada à apoptose, possui a capacidade de interromper os ciclos celulares e promover a replicação viral do HIV-1 (JACOTOT, 2000)

Portanto, o estado de ativação crônica do sistema imune nos pacientes HIV-1, é acompanhado concomitantemente por um processo de estresse oxidativo, que é definido como sendo um estado no qual os níveis de EROs neutralizam as defesas antioxidantes endógenas do hospedeiro, podendo ser uma consequência do excesso da produção de oxidantes ou da diminuição das defesas antioxidantes (BULGER; MAIER, 2001). E este meio pró-oxidante e

pró-inflamatório está envolvido tanto na replicação viral do HIV, via ativação do fator nuclear KappaB (NF- κ B), como também no aumento da susceptibilidade dos linfócitos à apoptose (LOOK et al., 1998; LI-WEBER et al., 2000).

As conseqüências da ativação crônica do sistema imune, e sua relação direta com os mecanismos de estresse oxidativo e apoptose, em pacientes infectados pelo HIV-1, vêm sendo estudadas junto com estratégias terapêuticas tradicionais, através da associação de antirretrovirais com compostos antioxidantes, como N-acetilcisteína, Vitamina C (Ascorbato), Vitamina A e Vitamina E (BUETTNER, 1993; ALLARD et al., 1998a; DE ROSA et al., 2000; TREITINGER et al., 2000). Estes estudos têm mostrado a capacidade destes compostos antioxidantes, em restabelecer e/ou prevenir o estresse oxidativo e a apoptose, porém, ainda se faz necessário um maior entendimento sobre o papel do estresse oxidativo envolvido na indução da apoptose (TREITINGER et al., 2000; JARUGA et al., 2002). O sistema de defesa antioxidante, é um sistema coordenado, onde a deficiência de um componente pode afetar a eficiência de outros (EVANS; HALLIWELL, 2001).

1.9 N-ACETIL-CISTEÍNA

A L-cisteína é um aminoácido que contém o radical sulfidril, sendo este um elemento de grande importância nos processos biológicos de oxiredução, por ser um precursor na síntese de glutathione (DROGE; BREITKREUTZ, 1999), que por sua vez, está envolvida em múltiplas funções celulares, e também desempenha um importante papel na manutenção da resposta imunológica (BEUTLER, 1989; DROGE; BREITKREUTZ, 1999)

A suplementação com compostos antioxidantes associados à terapia antirretroviral tem sido estudada como um meio para estabilizar o potencial redox, e, desta forma diminuir a replicação viral (WYLLIE, 1997). O uso da N-acetil-cisteína (NAC) foi proposto para pacientes infectados pelo HIV-1, por ser um agente antioxidante, e por ter sido demonstrado que, *in vitro*, a NAC impediu a replicação viral (WYLLIE, 1997).

CHAPPLE (1997), em estudo realizado com objetivo de avaliar as concentrações do composto cisteína e, conseqüentemente, da glutathione no citosol, fazendo uso da cisteína na forma sintética n-acetilada, demonstrou que

a ativação do fator nuclear κ B mediada por EROs, pode ser bloqueada por este antioxidante.

Alguns estudos demonstraram que, em pacientes infectados pelo HIV, ocorre um decréscimo nos níveis plasmáticos de cisteína, sendo ainda mais importante a queda dos níveis de glutathione nos estágios assintomáticos da infecção, indicando com isso, que a deficiência destes compostos não são encontrados somente em pacientes em estágios mais avançados da infecção, mas sim, em estágios precoces e sem manifestações clínicas da doença (DROGE; BREITKREUTZ, 1999; AKERLUND et al., 1996; JAHOOOR et al., 1999).

O aminoácido L-cisteína em sua forma livre é uma substância instável e facilmente sofre oxidação, e, por este motivo, não é indicado como suplemento no tratamento da infecção pelo HIV. A cisteína em sua forma oxidada tem a desvantagem de ser fracamente solúvel em água, tornando-se assim, um composto pouco absorvido pelo trato gastrointestinal. Já, a sua forma N-acetilada, é mais resistente à oxidação e é facilmente convertida em cisteína e glutathione (GSH) pelo fígado (DE ROSA et al., 2000).

HORTIN e colaboradores (1994) propuseram, como meio de atenuar os efeitos das deficiências de cisteína e glutathione no plasma, e os efeitos verificados sobre o sistema imunológico, a suplementação com o composto N-acetil-cisteína associado à terapia antirretroviral.

Em estudos preliminares, o uso da NAC demonstrou um possível efeito benéfico e complementar naqueles pacientes infectados pelo HIV-1, tratados com terapia antirretroviral e com a síndrome da imunodeficiência instalada (JARSTRAND; AKERLUND, 1994; AKERLUND et al., 1996).

AKERLUND e colaboradores (1996) também demonstraram que a suplementação com NAC diminuiu as concentrações de $\text{TNF-}\alpha$, bem como estabilizou a contagem de linfócitos CD4^+ . Já OLIVIER e colaboradores (1995) caracterizaram uma tendência de linfócitos CD4^+ provenientes de pacientes infectados pelo HIV-1, a entrarem em apoptose, de modo que este estado poderia ser minimizado ou revertido pelo uso de NAC.

Contudo, os estudos até agora realizados fazendo uso da NAC, foram realizados por períodos de observação considerados curtos, e com doses inadequadas (DROGE; BREITKREUTZ, 1999). Com isso, a avaliação da

suplementação da NAC à terapia antirretroviral, por um período mais prolongado e com uma dose considerada mais adequada, poderia promover um conjunto de resultados mais efetivos.

1.10 ASCORBATO

O ascorbato, ou ácido L-ascórbico, é sintetizado pelo fígado na maior parte dos mamíferos, contudo, em humanos esta capacidade está ausente, tornando nutricionais as necessidades deste composto no organismo humano, dependentes de um eficiente mecanismo de absorção, transporte, e manutenção nos tecidos (ROSE,1988). O Ascorbato absorvido é distribuído para os tecidos e também permanece no sangue, onde exerce uma de suas principais e mais importantes funções, a de potente agente antioxidante. Esta ação antioxidante não está somente ligada à sua capacidade direta de neutralizar radicais livres no plasma, mas também, na sua capacidade de proteger e reciclar a vitamina E ou radical alfa-tocoferoxil nas lipoproteínas e, provavelmente, nos eritrócitos (MAY, 1998).

Alguns estudos já mostraram que o ascorbato é um antioxidante primário no plasma, sendo sua presença requerida para prevenir a formação de hidroperóxidos de lipídeos. No plasma, atua de forma protetora contra a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), que é mediada por peróxidos no plasma sanguíneo (FREI; ENGLAND; AMES, 1989; FREI; STOCKER; ENGLAND, 1990), e também mediante o sinergismo com o alfa-tocoferol nos processos de estresse oxidativo, gerador de ERO (ALLARD et al., 1998a).

A função antioxidante do ascorbato deve-se ao seu potencial redutor de suas pontes duplas de carbono, o que rapidamente permite a doação de um ou dois hidrogênios e elétrons para uma variedade de agentes oxidantes, incluindo radicais livres, peróxidos, e superóxidos (BUETTNER, 1993). A oxidação do ascorbato, resultante de sua reação com EROs é um mecanismo reversível, o que permite, assim, o seu reciclo e sua volta à forma de ascorbato (MENDIRATTA; QU; MAY, 1998). A forma parcialmente oxidada do ascorbato é chamada de radical livre monoascorbil, e serve como um acceptor ou doador de elétrons, sendo esta forma muito estável e pouco tóxica. A perda de um

segundo elétron resulta na formação do dehidroascorbato, forma esta que pode ser reduzida à forma de ascorbato (DHARIWAL; HARTZELL; LEVINE, 1991).

O prévio conhecimento sobre estresse oxidativo, mostra que as EROs causam lesão direta por meio de dano oxidativo às proteínas celulares e aos ácidos nucleicos do DNA, bem como pela indução da peroxidação de lipídios, que leva à destruição da membrana celular (BERGER, 2001). Por sua vez, a ação antioxidante do ascorbato, assim, se dá pela atuação como um scavenger de EROs e também espécies reativas de nitrogênio, prevenindo contra o estresse oxidativo das macromoléculas biológicas: DNA, lipídios e proteínas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989; FREI et al., 1990; HALLIWELL, 1996; CARR; FREI, 1999).

Dentre as EROs presentes no processo de estresse oxidativo, e que atuam de forma preponderante, temos os radicais hidroxila (HO^\bullet), o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o dióxido de nitrogênio (NO_2), bem como as espécies não radicalares, o ácido hidrolcoroso (HOCl), o oxigênio singlet ($^1\text{O}_2$), espécies nitrosadas ($\text{N}_2\text{O}_3/\text{N}_2\text{O}_4$) e o peroxinitrito (ONOO^-) (CROSS, 1994).

Associado à condição de scavenger de EROs, o ascorbato também regenera outras pequenas moléculas antioxidantes, como a glutathiona (GSH), o β -caroteno e suas respectivas espécies radicalares (HALLIWELL, 1996). O entendimento sobre a função do ascorbato atuando como um co-antioxidante junto ao α -tocoferol nas células e isolados lipoprotéicos já está bem estabelecido na literatura (BOWRY et al., 1995; BULGER, 1998), porém, ainda é necessário um melhor entendimento sobre o reciclo do ascorbato *in vivo* (JACOB; BURRI, 1996). Tem-se mostrado também que o ascorbato atua como um “poupador” de glutathiona durante condições de aumento do estresse oxidativo, *in vivo* (MEISTER, 1994), sendo que a mesma glutathiona também está envolvida na redução do ácido dehidroascórbico intracelular, reciclando e formando, assim, o ascorbato (MAY, 1998).

A gênese de manifestações clínicas tem sido diretamente ligada ao estresse oxidativo e seus produtos, como nos estados inflamatórios sistêmicos, doenças degenerativas do sistema nervoso e AIDS (BULGER; MAIER, 2001). O estresse oxidativo é um dos principais mecanismos que leva à progressão da AIDS naqueles pacientes infectados pelo HIV-1 (JARUGA et al., 2002), os quais

apresentam diminuição nas concentrações de micronutrientes antioxidantes como vitamina E, β -caroteno e ascorbato (ALLARD et al., 1998a, b). Este processo de diminuição da capacidade antioxidante se deve à grande produção e acúmulo de EROs durante ativação de leucócitos polimorfonucleares e macrófagos, sendo assim, resultado do próprio curso da resposta imune à infecção pelo HIV-1, onde há também uma influência direta dos próprios genes virais (JARUGA et al., 2002).

Wang e colaboradores (1994) demonstraram que as EROs atuam como fatores coadjuvantes na progressão da infecção em pacientes assintomáticos e com AIDS. Já, Schreck e colaboradores (1991) demonstraram que em células infectadas pelo HIV-1, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), induziu a ativação da expressão do genoma viral através da transativação do NF- κ B, enquanto que Meller (1992) conclui também que as EROs ativam a transcrição nuclear NF- κ B, induzindo a expressão e estimulação da replicação viral.

A ativação do NF- κ B por meio das EROs durante o estresse oxidativo celular pode ser inibida pelo uso de compostos antioxidantes como o ascorbato (HARAKEH; JARIWALLA; PAULING, 1990; HARAKEH; JARIWALLA, 1991; HARAKEH; JARIWALLA, 1995; BOWIE; O'NEIL, 2000), N-acetilcisteína (HARAKEH; JARIWALLA, 1997), glutationa e α -tocoferol (SCHRECK; RIEBER; BAEUERLE, 1991; SUZUKI; PACKER, 1993; WANG; WATSON, 1994).

Estudos prévios *in vitro* e *in vivo*, em pacientes soropositivos para o HIV e tratados com terapia anti-retroviral, mostraram a capacidade do ascorbato de interferir na replicação viral (HARAKEH; JARIWALLA, 1995), e tem sido caracterizado sua ação virucida e imunoestimulatória, tal como: fagocitose, quimiotaxia e adesão de neutrófilos, atuando ainda como potente agente antioxidante e diminuindo o estresse oxidativo gerado pela infecção viral (JARIWALLA; HARAKEH, 1996). O ascorbato também demonstrou ser capaz de regular a síntese de moléculas cruciais do sistema imune, como citocinas, anticorpos e interferons, e, interferir na ativação do NF- κ B inibindo-o por múltiplos estímulos, incluindo citocinas (JARIWALLA; HARAKEH, 1996; (JARIWALLA; HARAKEH, 1997; BOWIE; O'NEILL, 2000).

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Os estudos até então realizados na literatura, demonstraram que os pacientes infectados pelo HIV-1, quando comparados com indivíduos clinicamente saudáveis e soronegativos para este vírus, apresentam um estado crônico de estresse oxidativo, que é caracterizado pela quebra no balanço entre pró-oxidantes e antioxidantes. Além disto, há também alterações efetivas e complexas no sistema imunológico, como a progressiva depleção de linfócitos CD4⁺ e a secreção anormal de citocinas por células ativadas cronicamente, linfócitos e macrófagos. Estas anormalidades estão diretamente correlacionadas com o aumento da susceptibilidade dos linfócitos à apoptose, decorrente de estímulos provenientes do estresse oxidativo e à contínua replicação viral. Sendo assim, a TARV suplementada com o ascorbato, nutriente essencial, ou N-acetil-cisteína, ambos considerados agentes com potente ação antioxidante, poderiam apresentar efeito benéfico no controle do estresse oxidativo e na recuperação do sistema de defesa imune celular, o que permitiria uma maior e melhor sobrevida nestes pacientes infectados. Assim, a TARV suplementada com o ascorbato e N-acetil-cisteína em pacientes soropositivos para o HIV-1, necessitam ser melhor avaliadas.

Portanto, o objetivo desse estudo, duplo cego controlado por placebo, foi investigar e comparar, durante um período de 180 dias, o possível efeito dos compostos ascorbato e N-acetil-cisteína, quando estes são associados ao efeito inibidor da replicação viral dos antirretrovirais, através de parâmetros virológicos e celulares em pacientes soropositivos para o HIV-1. Para a consecução do objetivo proposto, foram avaliados os níveis de RNA do HIV-1, linfócitos CD4⁺, linfócitos CD8⁺, relação CD4/CD8, percentual de células

apoptóticas, percentual de células vivas e mortas, globulinas, IgA, IgG, IgM e β -2 microglobulina, antes dos pacientes iniciarem o tratamento antirretroviral (basal) e 60, 120 e 180 dias após o uso da terapia antirretroviral, acompanhada ou não da suplementação com ascorbato, via oral, divididos em 4 doses diárias de 500mg (2g/dia), 6 em 6 horas, e de N-acetil-cisteína, via oral, 600mg dia.

3. PACIENTES, MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

Participaram deste estudo 69 voluntários comprovadamente soropositivos para o HIV, diagnosticados por dois métodos com princípios metodológicos distintos, e confirmados por imunofluorescência indireta, conforme recomendado pelo Ministério da Saúde e aceito pela Organização Mundial da Saúde (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1996), e com indicação clínica para iniciarem o tratamento com fármacos antirretrovirais, com base nos critérios determinados pela Coordenação Nacional de DST/AIDS. A triagem clínica dos pacientes foi realizada por médicos infectologistas do Ambulatório de DST/AIDS do Centro de Saúde II da Secretaria da Saúde do Município de Florianópolis. Os pacientes devidamente esclarecidos que aceitaram participar do estudo, após assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido, foram encaminhados ao Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU/UFSC) para realizarem a coleta de amostra biológica (sangue) no sentido de determinar os níveis basais dos parâmetros laboratoriais propostos. A realização deste estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina, conforme consta do processo nº 026/99, cujo parecer encontra-se em anexo.

Todos os pacientes que participaram deste estudo foram classificados como assintomáticos, de acordo com as Recomendações do Ministério da Saúde e como portador do HIV (Z-21) de acordo com o Código Internacional de Doenças (BRASIL, 2000; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1998). Os 38 pacientes que concluíram sua participação no estudo foram submetidos à terapia antirretroviral conforme consta do quadro 4. Os demais pacientes foram excluídos do estudo por apresentarem intolerância ou não aderência à terapia proposta.

As amostras de sangue venoso dos pacientes foram colhidas por punção antero-cubital, pela manhã, utilizando-se sistema a vácuo. Foi coletado um total de 8 tubos: sendo retirados, aproximadamente, 10 mililitros de sangue em tubo (1) contendo heparina, 12 mililitros em tubos (4) sem anticoagulante e 8 mililitros em tubos (3) contendo EDTA.

Quadro 4. Protocolos dos tratamentos antirretrovirais a que foram submetidos os pacientes durante o estudo.

Tratamento anti-retroviral	Grupo Controle (n=15)	Grupo Ascorbato (n=13)	Grupo NAC (n=10)
AZT + 3TC + NVP	8	3	4
AZT + 3TC + NFV	-	1	-
AZT + 3TC + EFV	-	7	-
D4T + 3TC + AZT	-	1	-
D4T + 3TC + EFV	-	1	-
AZT + ddl + NVP	2	-	2
AZT + 3TC + ddl	1	-	-
AZT + 3TC	2	-	1
AZT + 3TC + IDV	2	-	2
ddl + 3TC + NFV	-	-	1

n = número de pacientes; AZT = zidovudina; 3TC = lamivudina; NVP = nevirapina; ddl = didanosina; NFV = nelfinavir; IDV = indinavir; EFV = efavirenz; D4T=

Após a coleta de sangue, todos os participantes deste estudo iniciaram o tratamento com terapia antirretroviral prescrita pelos médicos, assim como iniciaram o uso de placebo ou terapia suplementar. O conteúdo era desconhecido pelos médicos, pelo pesquisador e pelos pacientes, portanto, o estudo realizado foi do tipo duplo cego, controlado por placebo. Todos os pacientes que concluíram sua participação neste estudo apresentaram-se regularmente para acompanhamento clínico e terapêutico durante os 180 dias de duração do mesmo. Os pacientes submeteram-se às coletas de sangue para determinação dos níveis basais de carga viral, linfócitos CD4+, linfócitos CD8+, relação CD4/CD8, linfócitos vivos, linfócitos em apoptose, linfócitos mortos, globulinas, IgA, IgG, IgM e β -2 microglobulina, aos 60, 120 e 180 dias após o início dos tratamentos propostos, para avaliação dos mesmos.

Os pacientes que participaram do estudo foram divididos em três grupos, de acordo com a medicação suplementar ingerida. O grupo controle foi constituído pelos pacientes que, além da medicação antirretroviral, ingeriram placebo. Os dois outros grupos de pacientes, foram aqueles que, além da medicação antirretroviral, ingeriram diariamente 2g de ascorbato, em quatro administrações de 500mg (grupo ascorbato), ou fizeram uso diário de 600mg/dia de N-acetil-cisteína durante o período de estudo. O ascorbato utilizado neste estudo foi produzido pela Sanofi-Synthelabo LTDA, o qual é

comercializado com a denominação de CEWIN[®]. A N-acetil-cisteína foi produzida pela Zambon, sendo este comercializado com o nome de FLUIMUCIL[®].

3.2 FRACIONAMENTO DE AMOSTRA BIOLÓGICA (SANGUE)

Para a obtenção de soro e plasma, o sangue foi centrifugado a 2500 rpm (1050 g) em centrífuga Celm, modelo LS II durante 10 minutos. Após a primeira separação e obtenção de soro e plasma, estes foram novamente centrifugados para que fossem evitadas eventuais interferências de hemácias nas determinações a serem realizadas.

3.3 ISOLAMENTO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES

Após centrifugação do sangue a 1500 rpm (378 g) por 15 minutos, a camada de glóbulos brancos, formada entre o plasma e as hemácias, foi removida com pipeta de Pasteur e ressuspensa com 5 mL de solução salina tamponada com fosfato 0,01M (PBS), pH 7,4. Em seguida, a suspensão de células contendo leucócitos foi transferida lentamente para outro tubo contendo 2,5 mL de Ficoll-Paque, densidade 1,077 g/mL (*Sigma Chemical Company, Sant Louis, U.S.A.*) e centrifugada a 1500 rpm (378 g) durante 20 minutos em centrífuga clínica Celm, modelo LS-II. A camada de células localizada entre o tampão e o Ficoll-Paque foi retirada com pipeta de Pasteur, lavada duas vezes em PBS e sedimentada por centrifugação a 1000 rpm (168 g) por 10 minutos. Após as células mononucleares terem sido ressuspensas em meio RPMI 16 com 25 mM de HEPES e 2 mM de L-glutamina (*Sigma Chemical Company, Sant Louis, U.S.A.*), suplementado em 10% com soro bovino fetal inativado pelo calor, adicionou-se 10 UI/mL de penicilina, 10 µg/mL de estreptomicina e 2,5 µg/mL de anfotericina B.

3.4 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

Neste estudo, para a avaliação da viabilidade celular, as células mononucleares foram mantidas em 2,0 mL de meio RPMI 1640 com 25 mM de

HEPES e 2 mM de L-glutamina, suplementado em 10% de soro bovino fetal inativado, 10 UI/mL de penicilina, 10 µg/mL de estreptomicina e 2,5 µg/mL de Fungison, durante 48 horas a 37° C, em estufa com atmosfera com 5% de CO₂. Após este tempo, as células foram lavadas por centrifugação a 1000 rpm (168 g) por 10 minutos e ressuspensas com solução de PBS pH 7,4. Após a segunda centrifugação, as células foram marcadas com 200 µL da solução de uso de calceína AM 1 µM e homodímero-1 de etídio (EthD-1) (*Molecular Probes Incorporation, Eugene, Oregon, EUA*) em solução de PBS, pH 7,4. Após 15 minutos em repouso, o ensaio de viabilidade das células foi realizado no Laboratório Médico Santa Luzia, em citômetro de fluxo modelo FACSCallibur (*Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, U.S.A.*). A captura das células foi realizada através de dois programas, o CELLQuest e o PAINT-A-GATE.

O conjunto reativo para determinação de viabilidade e citotoxicidade *LIVE/DEAD*[®] (L-3224), contendo calceína AM e homodímero-1 de etídio (EthD-1), possibilita a determinação dos linfócitos viáveis, em apoptose e mortos. Por este método, as células viáveis são distinguidas pela presença de atividade intracelular da esterase, a qual é determinada pela conversão enzimática da calceína AM não fluorescente, que penetra na célula através de sua membrana íntegra, em calceína intensamente fluorescente. A fluorescência da calceína polianiónica é retida nas células viáveis, produzindo nestas uma intensa e uniforme fluorescência verde. Nas células em processo de morte celular verifica-se, progressivamente, menor atividade das esterases e maiores alterações físicas e/ou bioquímicas da membrana celular. Em consequência destas alterações, as células em apoptose tornam-se progressivamente incapazes de impedir a entrada de EthD-1, o qual tem sua fluorescência aumentada em 40 vezes, após ligar-se aos ácidos nucleicos, produzindo deste modo, uma fluorescência vermelha. As células inviáveis, por não apresentarem atividade estearásica, são marcadas intensamente pelo EthD-1, o que as distingue das demais células.

Após as células mononucleares marcadas serem adquiridas no citômetro de fluxo modelo FACSCallibur (*Becton Dickinson. U.S.A.*), através do programa CELLQuest, as células e/ou estruturas foram selecionadas de acordo com o

seu volume e sua granulosidade, sendo que as células e/ou estruturas maiores, entre as quais encontram-se os monócitos, foram excluídas visto que a análise de sua viabilidade não foi objeto deste estudo.

Na figura 8 verifica-se que entre as células selecionadas existem três grupos distintos, os quais podem ser classificados como: a) as células viáveis, que constituem o grupo de células localizadas no quadrante inferior direito e que foram marcadas mais intensamente pela calceína; b) as células em apoptose, que constituem o grupo de células localizado no quadrante inferior esquerdo e que foram marcadas pela calceína e pelo EthD-1, com intensidade variada, de acordo com o estágio do processo de apoptose em que se encontram; e c) as células mortas, que se encontram nos quadrantes superiores, as quais foram intensamente marcadas pelo homodímero de etídio. Entretanto, é importante ressaltar que este programa não permite excluir todas as células e/ou estruturas que não se desejam analisar, bem como não permite quantificar cada um dos grupos descritos anteriormente. Portanto, as imagens das células e/ou estruturas selecionadas devem ser salvas em arquivo específico, de modo que fosse possível a sua análise através de outro programa, o PAINT-A-GATE.

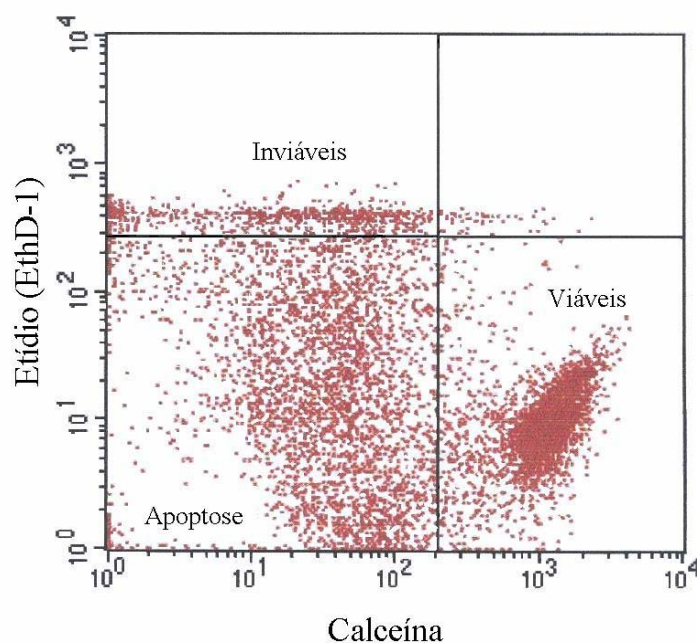


Figura 8. Distribuição das células e/ou estruturas selecionadas, através do CELLQuest, de acordo com a intensidade com que estas foram marcadas pela calceína e/ou homodímero de etídio.

No PAINT A GATE realizou novamente a seleção das células e/ou estruturas de acordo com o seu volume e sua granulosidade. Assim, as células mononucleares maiores, como os monócitos e as células que apresentara granulações, como os segmentados, que não foram separadas através do isolamento das células mononucleares pelo Ficoll-Paque, foram excluídas.

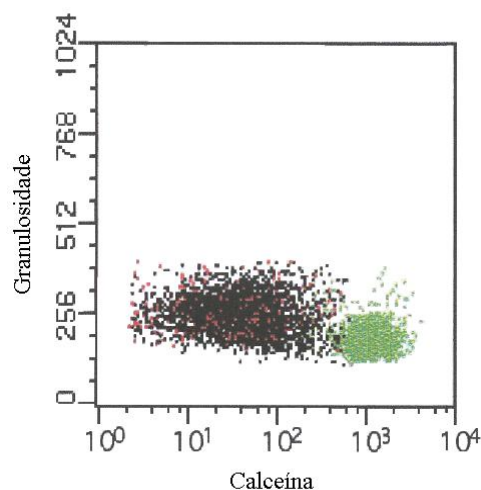


Figura 9. Distribuição das células selecionadas, através do PAINT A GATE, de acordo com a sua granulosidade e a intensidade com que foram marcadas pela calceína.

Na tela que constitui a figura 9, visualizam-se todas as células (linfócitos) selecionadas, distribuídas de acordo com a sua granulosidade e a intensidade com que foram marcadas pela calceína. É importante ressaltar, contudo, que as imagens dos linfócitos nestas duas etapas da análise de sua viabilidade celular, ainda não apresentara a coloração.

Na imagem correspondente à figura 10, observa-se que a distribuição das células é semelhante àquela verificada na figura 8. Entretanto, o programa PAINT-A-GATE permite que os linfócitos dos três grupos distintos sejam selecionados e coloridos. Inicialmente são, então, excluídas as estruturas que se concentram próximo ao eixo y, visto que são, provavelmente, fragmentos celulares restantes. Em seguida foram colorido os linfócitos marcados mais intensamente com calceína, que constituem o grupo localizado mais à direita, em verde. Após esta etapa, os linfócitos marcados mais intensamente pelo homodímero de etídio, que formam o grupo localizado na parte superior, foram

coloridos de vermelho, e os linfócitos marcados gradativamente com menos intensidade pela calceína e com mais intensidade pelo homodímero de etídio, que constituem o grupo intermediário, foram coloridos de branco, mas que, em consequência do fato de o fundo da imagem na tela do computador ser negra, aparecem na figura 9 como pontos negros.

Assim, após a seleção das células e/ou estruturas através do CELLQuest e do PAINT A GATE, considerando sempre a granulosidade e o seu volume, e a exclusão final das estruturas que se encontram muito próximas ao eixo **y**, ou seja, foram marcadas praticamente apenas pelo homodímero de etídio, pode-se afirmar, com elevado grau de certeza, que serão analisados apenas os linfócitos (Figura 10).

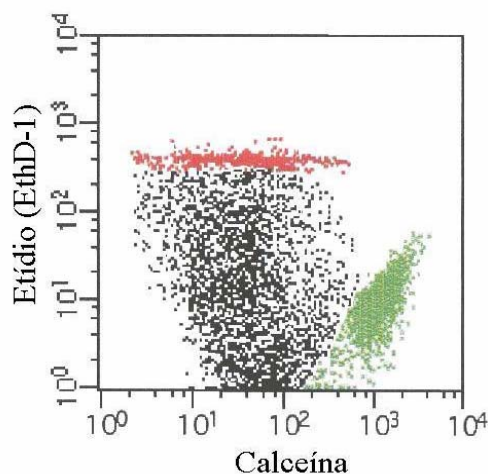


Figura 10. Distribuição dos linfócitos, obtida através do PAINT A GATE, de acordo com a intensidade de sua marcação pela calceína e/ou pelo homodímero de etídio.

Ao final da avaliação da viabilidade celular dos linfócitos, realizada como descrito, obtém-se a proporção (%) dos linfócitos viáveis, em processo de apoptose e inviáveis (Figura 11). Entretanto, é importante assinalar que os linfócitos não marcados com uma das cores escolhidas são reconhecidos como eventos não classificados, devendo-se então proceder a correção da falha através da marcação com calceína e brometo de etídio, utilizando-se o PAINT A GATE.

O conjunto reativo *LIVE/DEAD*[®] (L-3224), contendo calceína AM e homodímero-1 de etídio (EthD-1), utilizado neste estudo, foi desenvolvido para quantificar simultaneamente células viáveis e células mortas, mas pode também ser utilizado para quantificar células em apoptose (JACOBSEN, 1996; WEIL, 1996; MOLECULAR PROBES INCORPORATION, 1999). Entretanto, é importante ressaltar que este método não é específico para quantificar células em apoptose.

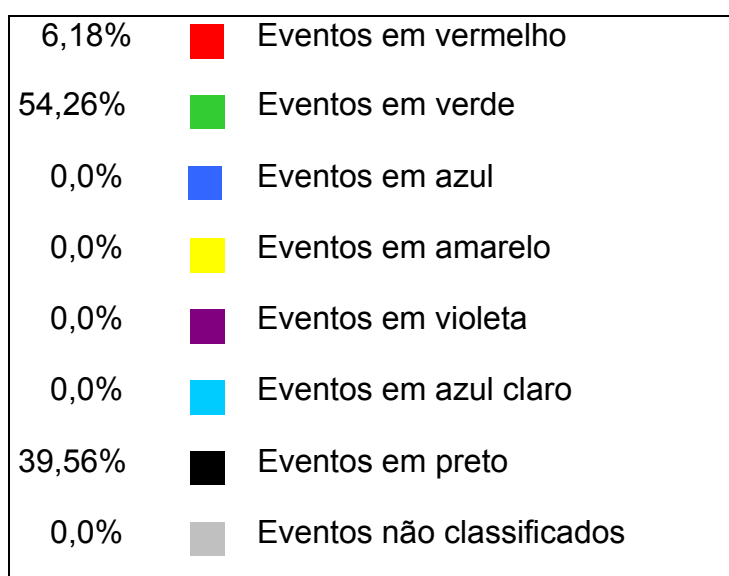


Figura 11. Resultado final da avaliação da viabilidade celular de linfócitos.

3.5 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE RNA DO HIV (CARGA VIRAL)

As determinações foram realizadas utilizando-se sangue total, que foi centrifugado a 1500 rpm, por 10 minutos, para que fosse possível a separação do plasma. O plasma então obtido da separação foi armazenado em solução tampão lisante (Tiocianato de guanidina) para posterior determinação. A amostra é viável por 24 horas se armazenada a 20°C, por sete dias se armazenada a -8° C e, por tempo indeterminado, se armazenada a -70° C.

A quantificação das partículas virais foi realizada por metodologia NASBA (*Nucleic Acid Sequence-Based Amplification*) através do teste NucliSens HIV-1 QT, produzido pela Organon Teknika BV (Boxtel, NL), que é um teste de

amplificação do RNA do HIV-1 presente na amostra. A quantidade do RNA amplificado é medida por eletroquimioluminescência (ECL).

O teste NucliSens HIV-1 QT compreende quatro conjuntos reativos diferentes, um para cada fase distinta:

- a) *NucliSens Lysis Buffer*, para a liberação de ácidos nucleicos;
- b) *NucliSens HIV QT*, para o isolamento dos ácidos nucleicos;
- c) *NucliSens HIV QT*, para a amplificação dos ácidos nucleicos;
- d) *NucliSens HIV QT*, para a detecção dos ácidos nucleicos.

A liberação dos ácidos nucleicos é realizada através da adição de 2mL de amostra de plasma ao tampão de lise, que contém tiocianato de guanidina e Triton X-100. Nesta etapa são desintegradas quaisquer partículas virais e células, bem como inativadas as RNases e DNases presentes na amostra. Aos ácidos nucleicos liberados, presentes no tampão de lise, são adicionados três RNA sintéticos (Qa, Qb e Qc) de concentração conhecida, respectivamente, alta, média e baixa, os quais servem como calibradores internos. Cada um destes RNA sintéticos utilizados como calibradores internos, difere do RNA do HIV de tipo selvagem (WT, do inglês *wild type*), presente na amostra, em apenas uma pequena seqüência de bases. Em meio de elevada concentração salina, os ácidos nucleicos presentes no tampão ligam-se ao dióxido de silício adicionado à solução. As partículas de dióxido de silício funcionam como fase sólida e são lavadas várias vezes com o tampão de lavagem (2X), etanol 70% (2X) e acetona (1X). Em seguida, os ácidos nucleicos são eluídos da fase sólida com tampão de eluição.

A amplificação dos ácidos nucleicos eluídos baseia-se na transcrição repetida, onde são sintetizadas múltiplas cópias de cada HIV de tipo selvagem e da seqüência-alvo do calibrador de RNA, pela polimerase de RNA do T7, através de uma molécula de DNA intermediária que contém o promotor de cadeia dupla para a polimerase de RNA do T7. Cada cópia formada entra em um novo ciclo de amplificação. A metodologia utilizada não requer separação de cadeias e, deste modo, o processo de amplificação é isotérmico e contínuo.

A detecção do RNA do HIV-1 presente na amostra baseia-se no princípio da eletroquimioluminescência do leitor *NucliSens Reader*. Para diferenciar os

RNA amplificados (WT, Qa, Qb e Qc) adicionam-se alíquotas da amostra a quatro diferentes soluções de hibridização específicas para um dos RNA amplificados. Os RNA são hibridizados com esferas-oligo (um oligo ligado a esferas revestidas com estreptavidina) e uma sonda marcada com rutênio. As esferas paramagnéticas que transportam as sondas hibridizadas e amplificadas são capturadas à superfície de um eletrodo por meio de um campo magnético. A voltagem que é aplicada ao eletrodo desencadeia a reação de eletroquimioluminescência. A luz emitida pelas sondas hibridizadas marcadas com rutênio é proporcional à quantidade de RNA amplificado. Os cálculos baseados nas quantidades relativas dos quatro RNA amplificados revelam a quantidade de RNA do HIV originalmente presente na amostra.

3.6 QUANTIFICAÇÃO DE LINFÓCITOS CD4+ E CD8+

As contagens de linfócitos CD4+ e CD8+ foram realizadas através de citômetro de fluxo modelo Facs Count™ (*Becton Dickinson U.S.A.*), em amostras de sangue total, colhidas em tubos contendo EDTA, por sistema de vácuo, utilizando conjuntos reativos contendo anticorpos monoclonais CD4/CD3 e CD8/CD3 (*Becton Dickinson U.S.A.*) para quantificar os linfócitos CD3+, CD4+ e CD8+. A relação CD4/CD8 foi obtida pela divisão do número de linfócitos CD4+ pelo número de linfócitos CD8+. Para calibração do sistema foram utilizados os conjuntos FACSCount™ Control que contém os controles: zero, baixo, médio e alto. As contagens de linfócitos CD4+ e CD8+ foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas – HU, da Universidade Federal de Santa Catarina.

3.7 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE GLOBULINAS

Os níveis séricos das globulinas foram obtidos subtraindo-se a concentração de albumina da concentração de proteínas totais. A determinação da concentração sérica de proteínas totais e albumina foi realizada através do sistema automático Dimension AR® da Dade Behring Incorporation Newark, U.S.A..

3.8 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE IMUNOGLOBULINAS (IgA, IgG e IgM)

Os níveis séricos de IgA, IgG e IgM foram determinados por nefelometria, utilizando-se anti-soros específicos produzidos pela Beckman Instruments Inc. USA. As determinações foram realizadas em analisador automático modelo Array[®] 360 System produzidos pela Beckman Instruments Inc. Brea, CA. U.S.A..

3.9 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE β -2 MICROGLOBULINA

Os níveis séricos de β_2 microglobulina foram determinados através de ensaio enzimático imunométrico quimiluminiscente de fase sólida, utilizando-se conjuntos reativos *IMMULITE[®] Beta-2 Microglobulin*, produzidos pela DPC[®] (*Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, U.S.A.*).

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para todas as variáveis estudadas, as quais foram comparadas inter e intra-grupos, os resultados foram expressos através de média aritmética (M) e desvio padrão (DP). Na análise inter-grupos o efeito dos tratamentos ao longo do tempo foi avaliado através de Análise de Variância Multivariada de Medidas Repetidas, utilizando-se os testes de Pillai's trace, Wilks' Lambda, Hotelling's Trace e Roy's Largest Root, considerando o efeito do fator tempo, e a interação entre os fatores tempo e tratamento. Para as análises intra-grupo, foi realizado análise de contrastes ortogonais, por contraste de repetição, contraste de diferença e contraste de Helmert.

Para todos os valores obtidos em nosso estudo, foi utilizado nível de significância mínimo de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 NÍVEIS PLASMÁTICOS DO RNA DO HIV-1(CARGA VIRAL)

As médias dos níveis plasmáticos de RNA do HIV-1 apresentaram diminuição significativa em consequência do tempo de tratamento, para todos os grupos estudados ($p < 0,05$) (Tabela 1). Aos 60 dias de terapia antirretroviral, os pacientes do grupo controle, ascorbato e NAC, apresentaram níveis médios de RNA do HIV-1 significativamente menores que a média dos níveis basais. Aos 120 e 180 dias de tratamento, as médias de RNA do HIV-1 dos três grupos, também foram significativamente menores em relação às médias basais, porém, não houve diferença significativa em relação às médias verificadas aos 60 dias de tratamento. A análise de variância multivariada de medidas repetidas não caracterizou diferença nos níveis plasmáticos de RNA do HIV-1 entre os tratamentos ao longo do tempo ($p > 0,05$).

Tabela 1: Níveis basais de RNA do HIV-1 (cópias/mL), e após 60, 120 e 180 dias de iniciados os tratamentos, nos pacientes do grupo Controle, Ascorbato e NAC.

Grupo Controle (n=15)				
Tempo (dias)	Média*	Desvio Padrão	Valor Máximo	Valor Mínimo
0	144000 ^a	180299	720000	48000
60	5065 ^b	7013	12000	80
120	2311 ^b	5901	4900	80
180	2241 ^b	4419	4600	80
Grupo Ascorbato (n=13)				
Tempo (dias)	Média*	Desvio Padrão	Valor Máximo	Valor Mínimo
0	149107 ^a	177956	520000	3400
60	16558 ^b	49409	180000	80
120	8245 ^b	18209	61000	80
180	2736 ^b	7064	25000	80
Grupo N-Acetil-Cisteína (n=10)				
Tempo (dias)	Média*	Desvio Padrão	Valor Máximo	Valor Mínimo
0	87100 ^a	99050	310000	26000
60	19495 ^b	36071	110000	670
120	6111 ^b	10273	34000	80
180	7820 ^b	18832	47000	80

Análise de variância para as hipóteses H_0 :

Não existe diferença entre os tempos: $p < 0,05$

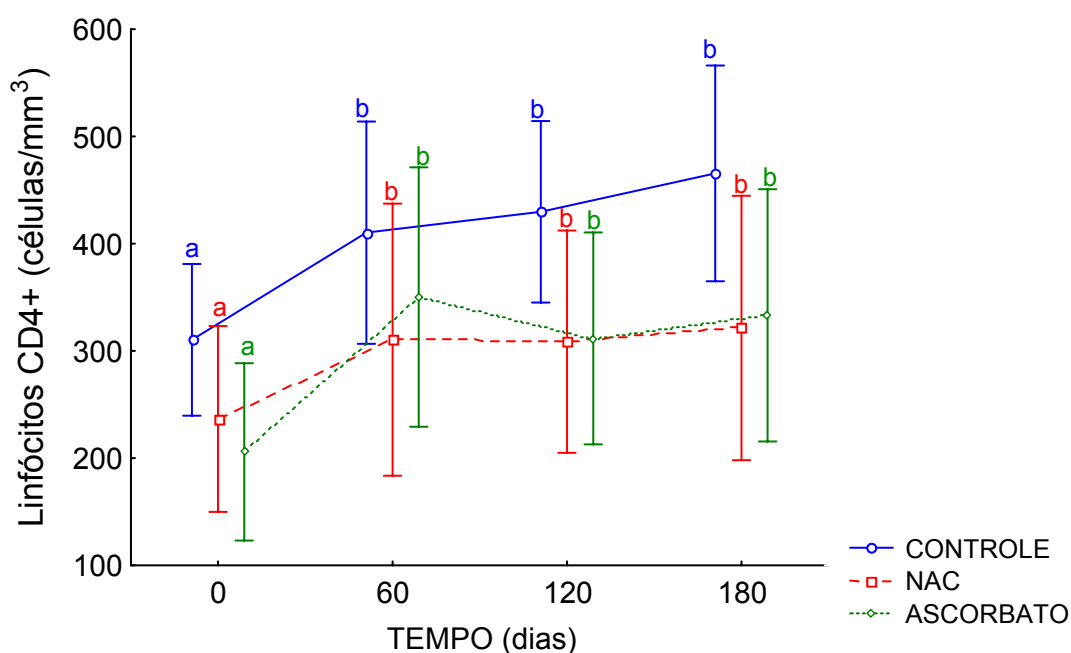
Não existe diferença entre os tratamentos ao longo do tempo: $p > 0,05$

Letras diferentes indicam diferenças significativas: $p < 0,05$

5.2 NÚMERO DE LINFÓCITOS CD4+

Para todos os grupos estudados: controle, ascorbato e NAC, a inferência estatística demonstrou que houve um aumento significativo da média do número de linfócitos CD4+, em consequência do tempo de tratamento ($p < 0,05$) (Figura 13). Os pacientes dos três grupos em estudo apresentaram aos 60 dias de tratamento, aumento significativo das suas médias de contagens de linfócitos CD4+, quando comparados às respectivas médias basais ($p < 0,05$). Contudo, aos 120 e 180 dias de tratamento, em todos os grupos, não se observou diferença significativa nos níveis de linfócitos CD4+ em relação às médias verificadas aos 60 dias de tratamento ($p > 0,05$) (Figura 12).

A análise de variância multivariada de medidas repetidas não caracterizou diferença estatística significativa nas determinações quantitativas do número de linfócitos CD4+, na avaliação dos fatores tempo e tratamento ($p > 0,05$) (Figura 12).



Efeito do fator Tempo: $p < 0,05$

Interação entre os fatores Tempo e Tratamentos: $p > 0,05$

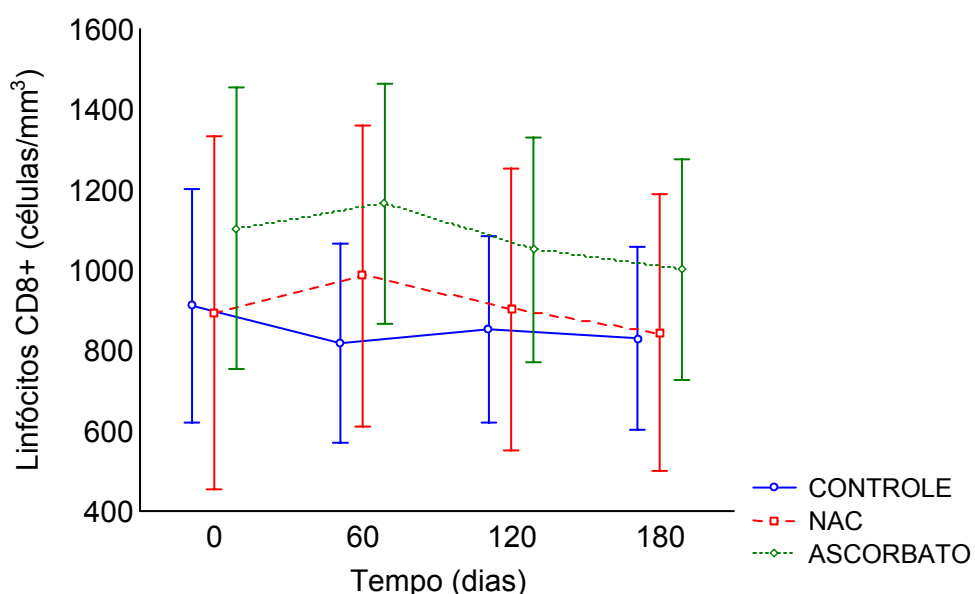
Letras diferentes indicam diferenças significativas: $p < 0,05$

Figura 12. Linfócitos CD4+ (células/mm³) nos tempos 0 (basal), 60, 120 e 180 dias, nos grupos Controle, Ascorbato e N-Acetil-Cisteína (Média e Desvio Padrão).

5.3 NÚMERO DE LINFÓCITOS CD8+

Nas determinações das médias de linfócitos CD8+, os grupos ascorbato e NAC, não obtiveram aumento significativo de suas médias aos 60 dias de tratamento, em relação às suas médias basais ($p < 0,05$). O grupo controle, também, neste mesmo período, e durante todo tempo de tratamento, não caracterizou nenhuma diferença significativa em relação à média basal ($p > 0,05$) (Figura 13). As médias dos tempos 120 e 180 dias do grupo ascorbato e NAC, não demonstraram diferenças significativas em relação ao tempo 60 (dias), somente em relação à média basal ($p < 0,05$) (Figura 13).

A análise de variância multivariada de medidas repetidas não caracterizou diferença estatística significativa nas determinações quantitativas do número de linfócitos CD8+, na avaliação dos fatores tempo e tratamento ($p > 0,05$) (Figura 13).



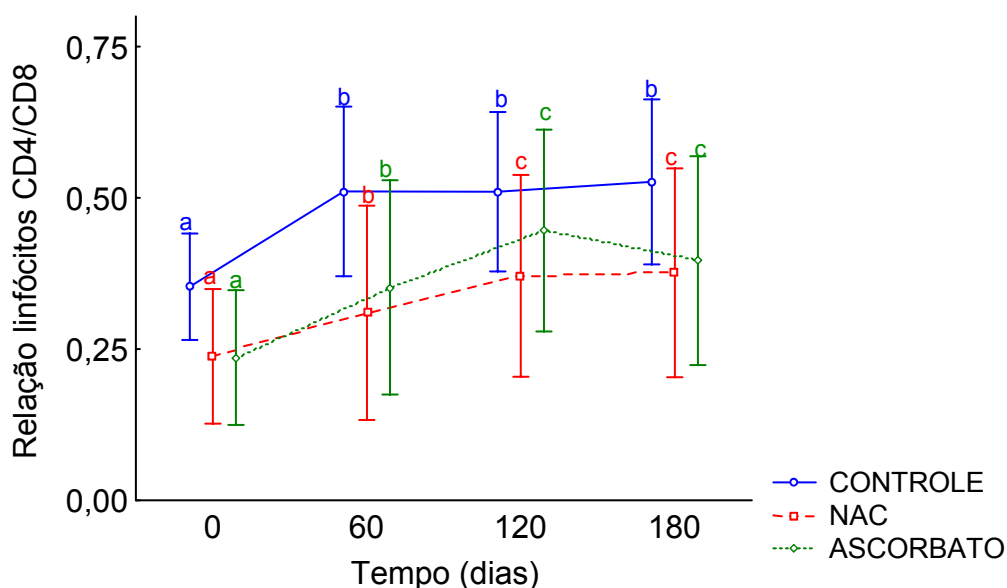
Efeito do fator Tempo: $p > 0,05$
Interação entre os fatores Tempo e Tratamentos: $p > 0,05$

Figura 13. Linfócitos CD8+ (células/mm³) nos tempos 0 (basal), 60, 120 e 180 dias, nos grupos Controle, Ascorbato e N-Acetil-Cisteína (Média e Desvio Padrão).

5.4 RELAÇÃO ENTRE O NÚMERO DE LINFÓCITOS CD4+ E O NÚMERO DE LINFÓCITOS CD8+ (Rel: CD4/CD8)

Na análise das médias obtidas na relação CD4/CD8, os grupos controle, ascorbato e NAC, apresentaram aumento significativo em consequência do tempo de tratamento, aos 60 dias de terapia ($p < 0,05$) (Figura 14). Aos 120 e 180 dias, apenas os grupos ascorbato e NAC apresentaram diferença significativa em relação às médias basais do tempo 60 (dias) ($p < 0,05$). O grupo controle, aos 120 e 180 dias de tratamento, manteve-se sem alterações em relação aos 60 dias ($p > 0,05$), demonstrando diferença significativa apenas em relação à média basal (Figura 14).

A análise de variância não caracterizou diferença significativa na relação CD4/CD8 entre os tratamentos ao longo do tempo ($p > 0,05$) (Figura 14).



Efeito do fator Tempo: $p < 0,05$
Interação entre os fatores Tempo e Tratamentos: $p > 0,05$
Letras diferentes indicam diferenças significativas: $p < 0,05$

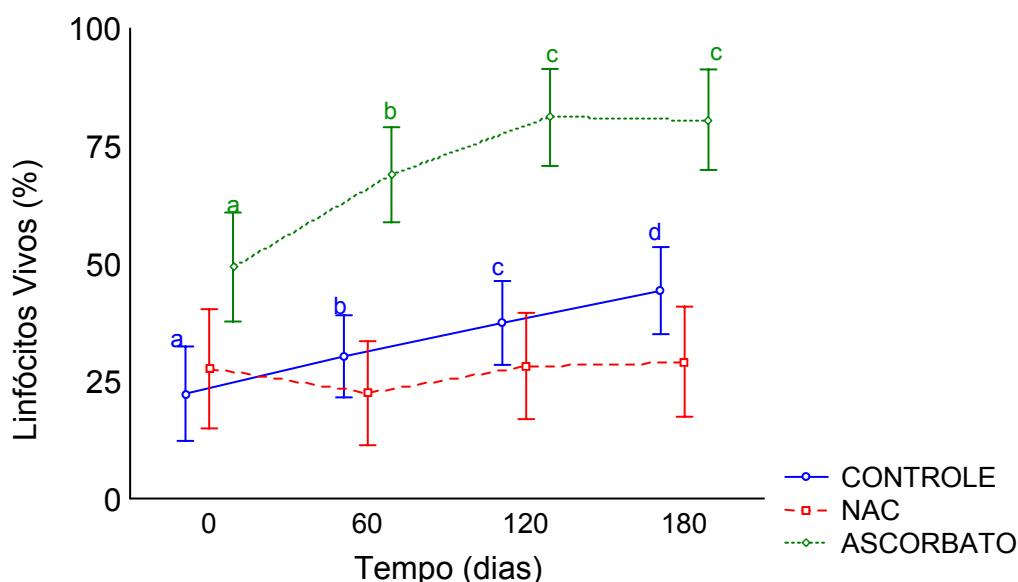
Figura 14. Relação CD4/CD8 nos tempos 0 (basal), 60, 120 e 180 dias, nos grupos Controle, Ascorbato e N-Acetil-Cisteína (Média e Desvio Padrão).

5.5 PERCENTUAL DE LINFÓCITOS VIVOS

A inferência estatística demonstrou que nos grupos ascorbato e controle, houve aumento significativo, em consequência do tempo de tratamento, no percentual de linfócitos vivos ($p < 0,05$) (Figura 15).

O grupo ascorbato apresentou aos 120 e 180 dias, diferença significativa em relação às médias basais, e também em relação aos 60 dias de terapia ($p < 0,05$). Contudo, as médias obtidas aos 120 e 180 foram estatisticamente semelhantes ($p > 0,05$). No grupo NAC, não se verificou diferença significativa durante o período de estudo ($p > 0,05$). O grupo controle, apresentou um progressivo aumento de suas médias, caracterizando uma diferença significativa em todos os tempos em relação à média basal ($p < 0,05$) (Figura 15).

A análise de variância multivariada de medidas repetidas caracterizou diferença significativa no percentual de linfócitos vivos entre os tratamentos ao longo do tempo ($p < 0,05$) (Figura 15).



Efeito do fator Tempo: $p < 0,05$
Interação entre os fatores Tempo e Tratamentos: $p < 0,05$
Letras diferentes indicam diferenças significativas: $p < 0,05$

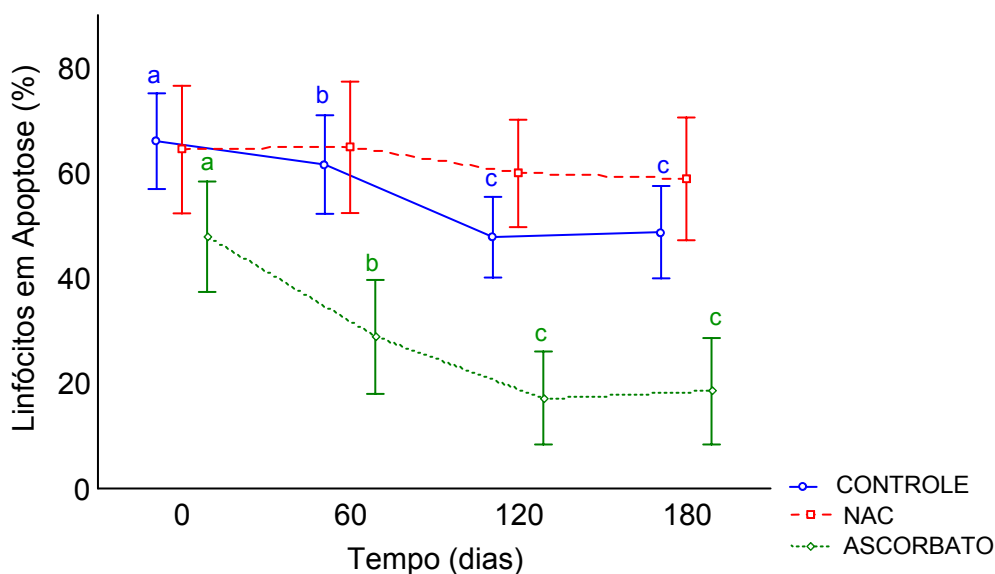
Figura 15. Linfócitos vivos (%) nos tempos 0 (basal), 60, 120 e 180 dias, nos grupos Controle, Ascorbato e N-Acetil-Cisteína (Média + Desvio Padrão).

5.6 PERCENTUAL DE LINFÓCITOS EM APOPTOSE

O grupo ascorbato apresentou diferença significativa em todos os tempos em relação à média basal ($p < 0,05$). Aos 180 dias, a média obtida não apresentou diferença significativa em relação à média do tempo 120 dias ($p > 0,05$), somente tendo apresentado diferença em relação ao tempo 60 dias e à média basal ($p < 0,05$) (Figura 16).

O grupo NAC não apresentou diferença significativa durante o período de estudo ($p > 0,05$) (Figura 16), e no grupo controle, observou-se uma diferença significativa em suas médias nos tempos 120 e 180 dias em relação à média basal e ao tempo 60 dias ($p < 0,05$). A média obtida aos 60 dias de terapia demonstrou diferença significativa em relação à média basal ($p < 0,05$), não ocorrendo o mesmo aos 120 e 180 dias ($p > 0,05$) (Figura 16).

A análise de variância caracterizou diferença significativa no percentual de linfócitos em apoptose, quando avaliado o fator tratamento ao longo do tempo nos grupos estudados ($p < 0,05$) (Figura 16).



Efeito do fator Tempo: $p < 0,05$

Interação entre os fatores Tempo e Tratamentos: $p < 0,05$

Letras diferentes indicam diferenças significativas: $p < 0,05$

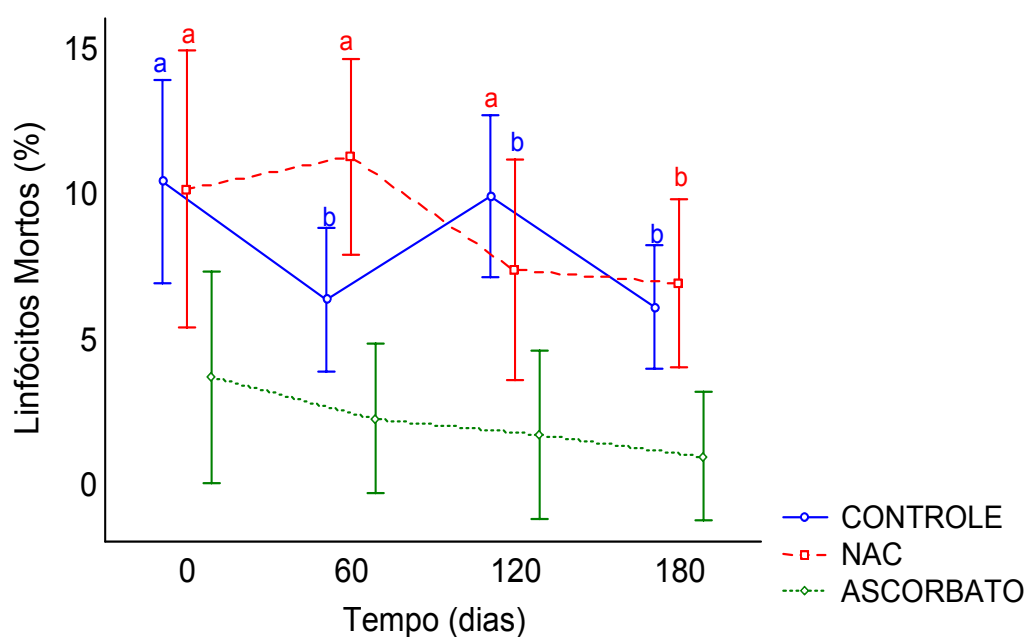
Figura 16. Linfócitos em apoptose (%) nos tempos 0 (basal), 60, 120 e 180 dias, nos grupos Controle, Ascorbato e N-Acetil-cisteína (Média e Desvio Padrão).

5.7 PERCENTUAL DE LINFÓCITOS MORTOS

Os grupos ascorbato e NAC apresentaram diferença significativa de suas médias aos 120 e 180 dias, em relação à média basal e ao tempo 60 dias ($p < 0,05$), não apresentando, porém, diferença significativa entre suas médias ($p > 0,05$). A diferença também não foi significativa quando comparado o tempo 60 dias com a média basal ($p > 0,05$) (Figura 17).

O grupo controle obteve diferença significativa somente aos 60 e 180 dias em relação à média basal ($p < 0,05$). O tempo 120 dias apresentou diferença significativa em relação aos tempos 60 e 120 dias, contudo, não apresentou diferença em relação à média basal ($p > 0,05$) (Figura 17).

A análise de variância não caracterizou diferença significativa no percentual de linfócitos mortos entre os tratamentos ao longo do tempo ($p > 0,05$) (Figura 17).



Efeito do fator Tempo: $p < 0,05$
Interação entre os fatores Tempo e Tratamentos: $p > 0,05$
Letras diferentes indicam diferenças significativas: $p < 0,05$

Figura 17. Linfócitos mortos (%) nos tempos 0 (basal), 60, 120 e 180 dias, nos grupos Controle, Ascorbato e N-Acetil-Cisteína (Média e Desvio Padrão).

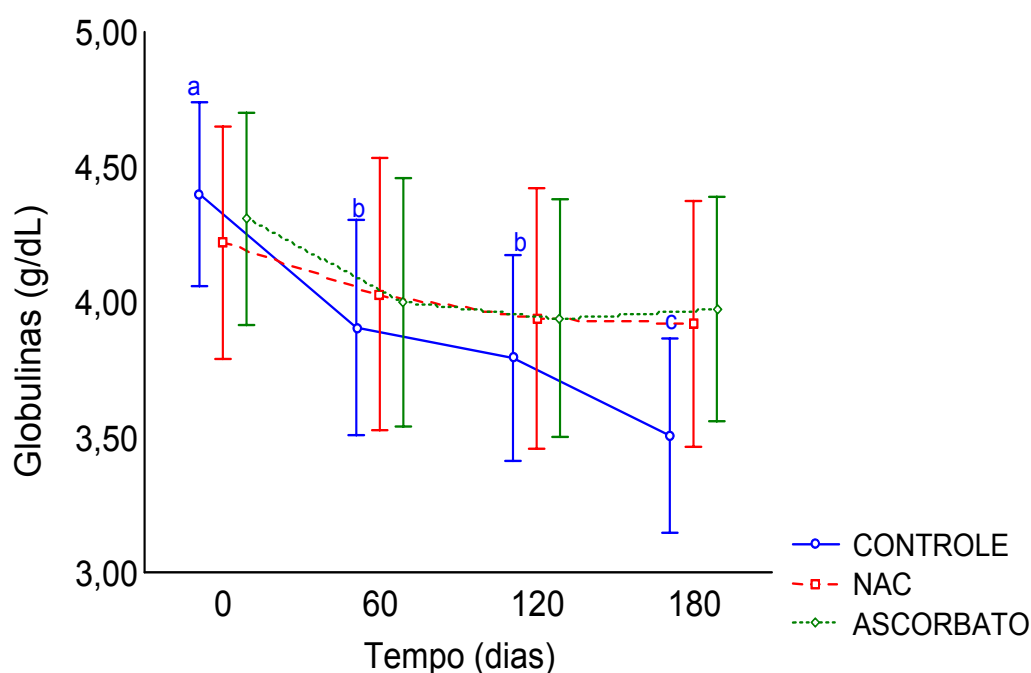
5.8 NÍVEIS SÉRICOS DE GLOBULINAS

As médias obtidas para globulinas apresentaram diferença significativa em consequência do tempo de tratamento ($p < 0,05$) (Figura 18).

O grupo controle apresentou diferença significativa em todos os tempos em relação à média basal e o valor da média do tempo 180 dias foi significativamente diferente dos demais tempos ($p < 0,05$).

Já os grupos ascorbato e NAC apresentaram diferenças significativas em todos os tempos em relação à média basal ($p < 0,05$), entretanto, não apresentou diferença significativa quando da comparação entre as médias dos tempos 60, 120 e 180 dias ($p > 0,05$).

A análise de variância não caracterizou diferença significativa no percentual de linfócitos mortos entre os tratamentos ao longo do tempo ($p > 0,05$) (Figura 18).



Efeito do fator Tempo: $p < 0,05$
Interação entre os fatores Tempo e Tratamentos: $p > 0,05$
Letras diferentes indicam diferenças significativas: $p < 0,05$

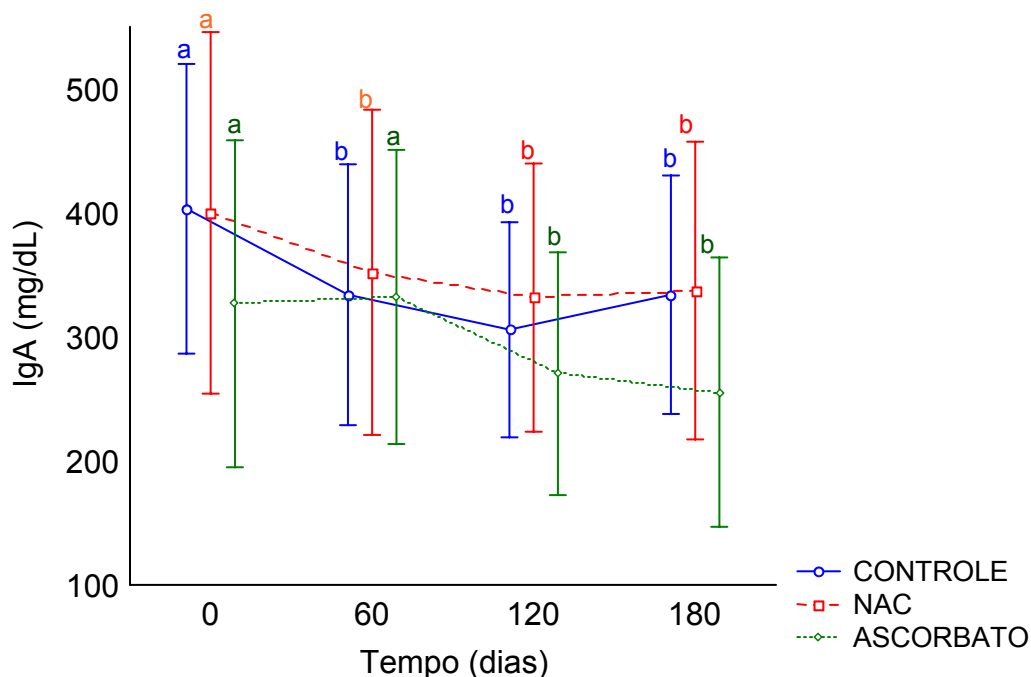
Figura 18. Níveis séricos de globulinas, nos tempos 0 (basal), 60, 120 e 180 dias, nos grupos Controle, Ascorbato e N-Acetil-Cisteína (Média e Desvio Padrão).

5.9 NÍVEIS SÉRICOS DE IgA

As médias de IgA para os grupos estudados, apresentaram diferença significativa em consequência do tempo de tratamento ($p < 0,05$) (Figura 19).

Os grupos controle e NAC apresentaram aos 60, 120 e 180 dias, diferença significativa em relação às suas médias basais ($p < 0,05$), não apresentando porém, diferença significativa entre suas médias ($p > 0,05$) (Figura 19). O grupo ascorbato apresentou diferença significativa de suas médias nos tempos 120 e 180 dias em relação às médias basais e 60 dias ($p < 0,05$).

A análise de variância não caracterizou diferença significativa nos níveis séricos de IgA, entre os tratamentos ao longo do tempo ($p > 0,05$) (Figura 19).



Efeito do fator Tempo: $p < 0,05$

Interação entre os fatores Tempo e Tratamentos: $p > 0,05$

Letras diferentes indicam diferenças significativas: $p < 0,05$

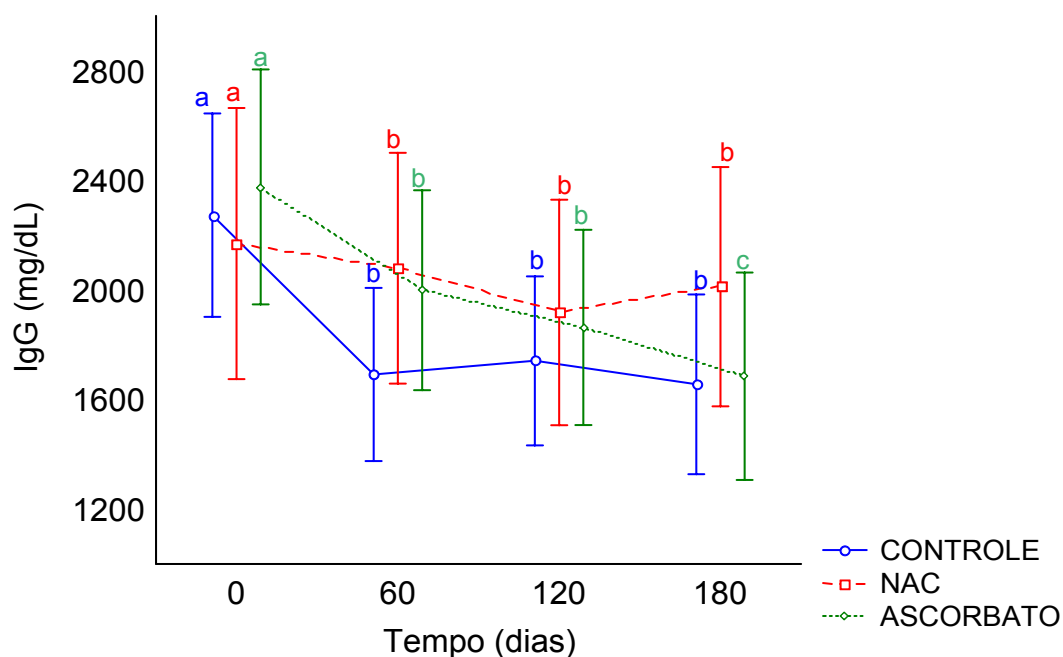
Figura 19. Níveis séricos de IgA, nos tempos 0 (basal), 60, 120 e 180 dias, nos grupos Controle, Ascorbato e N-Acetil-Cisteína (Média e Desvio Padrão).

5.10 NÍVEIS SÉRICOS DE IgG

As médias de IgG para os grupos estudados, apresentaram diferença significativa em consequência do tempo de tratamento ($p < 0,05$) (Figura 20).

Todos os grupos em estudo apresentaram diferença significativa aos 60, 120 e 180 dias em relação às suas médias basais ($p < 0,05$). Os grupos controle e NAC não apresentaram diferença significativa quando comparados às médias dos tempos 60, 120 e 180 dias, sendo que apenas o grupo ascorbato apresentou diferença significativa de sua média aos 180 dias em relação aos demais tempos ($p < 0,05$) (Figura 20).

A análise de variância não caracterizou diferença significativa no níveis séricos de IgG, entre os tratamentos ao longo do tempo ($p > 0,05$) (Figura 20).



Efeito do fator Tempo: $p < 0,05$

Interação entre os fatores Tempo e Tratamentos: $p > 0,05$

Letras diferentes indicam diferenças significativas: $p < 0,05$

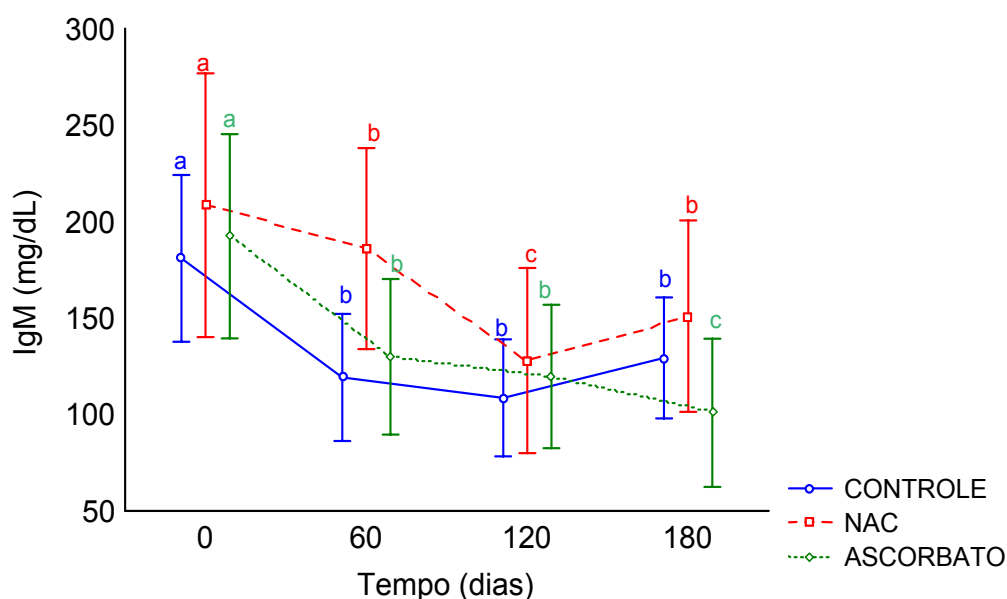
Figura 20. Níveis séricos de IgG, nos tempos 0 (basal), 60, 120 e 180 dias, nos grupos Controle, Ascorbato e N-Acetil-Cisteína (Média e Desvio Padrão).

5.11 NÍVEIS SÉRICOS DE IgM

A determinação dos níveis séricos de IgM demonstrou aumento significativo em consequência do tempo de tratamento para os grupos em estudo ($p < 0,05$) (Figura 21).

Os pacientes dos grupos controle e ascorbato apresentaram diferença significativa de suas médias, aos 60, 120 e 180 dias em relação às suas médias basais ($p < 0,05$), entretanto, não apresentaram diferenças significativas quando comparados às suas médias nos tempos 60, 120 e 180 dias ($p > 0,05$). O grupo NAC, aos 180 dias, apresentou diferença significativa em relação aos tempos 120 dias e à média basal, porém não apresentou diferença em relação ao tempo 60 dias ($p < 0,05$) (Figura 21).

A análise de variância multivariada de medidas repetidas, não caracterizou diferença significativa no níveis séricos de IgG, entre os tratamentos ao longo do tempo ($p > 0,05$) (Figura 21).



Efeito do fator Tempo: $p < 0,05$
Interação entre os fatores Tempo e Tratamentos: $p > 0,05$
Letras diferentes indicam diferenças significativas: $p < 0,05$

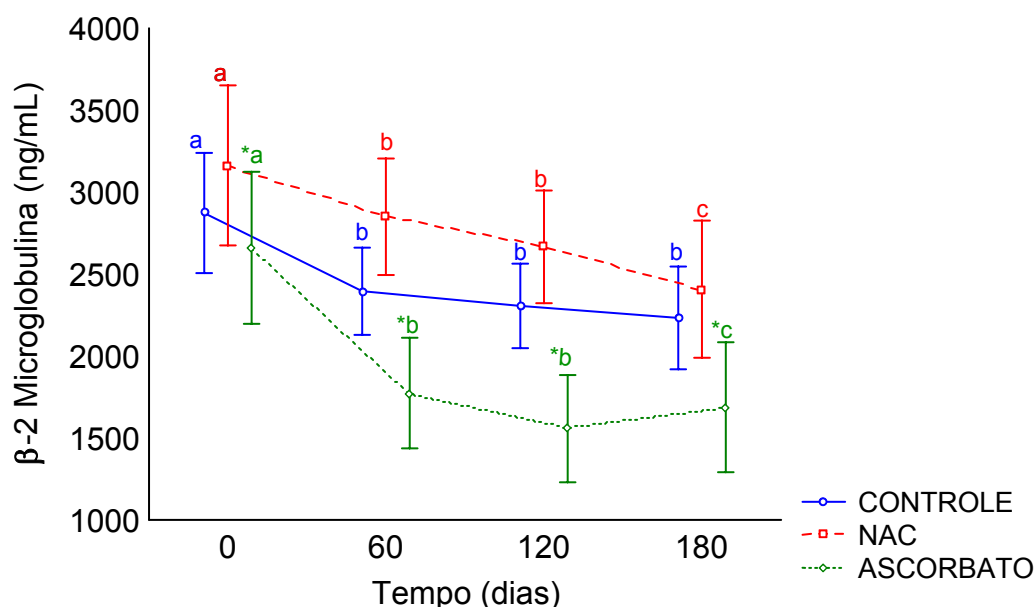
Figura 21. Níveis séricos de IgM, nos tempos 0 (basal), 60, 120 e 180 dias, nos grupos Controle, Ascorbato e N-Acetil-Cisteína (Média + Desvio Padrão).

5.12 NÍVEIS SÉRICOS DE β -2 Microglobulina

As médias obtidas para β -2 Microglobulina apresentaram diferença significativa em consequência do tempo de tratamento ($p < 0,05$).

Os grupos ascorbato e NAC apresentaram diferença significativa em suas médias no tempo 180 dias em relação às médias basais, 60 e 120 dias ($p < 0,05$), não apresentando, porém, diferenças entre as médias 60 e 120 dias ($p > 0,05$). O grupo controle apresentou diferença significativa aos 60, 120 e 180 dias em relação às médias basais, salientando que não apresentou diferenças entre suas médias. ($p > 0,05$) (Figura 22).

O grupo ascorbato apresentou diferença significativa no fator tratamento em relação aos demais grupos, porém, a análise de variância não caracterizou diferença significativa no níveis de β -2 Microglobulina, entre os tratamentos ao longo do tempo ($p > 0,05$) (Figura 22).



Efeito do fator Tempo: $p < 0,05$

**Efeito do fator tratamento : $p < 0,05$*

Interação entre os fatores Tempo e Tratamentos: $p > 0,05$

Letras diferentes indicam diferenças significativas: $p < 0,05$

Figura 22. Níveis séricos de β -2 Microglobulina, nos tempos 0 (basal), 60, 120 e 180 dias, nos grupos Controle, Ascorbato e N-Acetil-Cisteína (Média e Desvio Padrão).

6. DISCUSSÃO

A efetiva inibição da replicação viral e o restabelecimento numérico e funcional dos linfócitos CD4⁺ são os objetivos principais do tratamento de pacientes soropositivos para HIV-1, pois estas características sinalizam a reconstituição do sistema imunológico dos pacientes que fazem uso da terapia antirretroviral.

É diante deste contexto que o estado nutricional e os níveis séricos de micronutrientes essenciais, como vitamina C, vitamina E e outros compostos antioxidantes, como N-acetil-cisteína, têm sido apontados como cofatores importantes no curso da infecção pelo HIV-1 (CALDERON et al., 1990; HARAKEH; JARIWALLA, 1995; AKERLUND et al., 1996).

6.1. NÍVEIS PLASMÁTICOS DE RNA DO HIV-1

Nos pacientes infectados pelo HIV-1, a redução dos níveis plasmáticos do número de cópias do RNA do HIV-1 indica a adesão dos pacientes ao tratamento antirretroviral e a ausência de resistência viral aos medicamentos. Também as determinações dos níveis de RNA viral durante a terapia antirretroviral, permitem avaliar a eficácia dos medicamentos que constituem esta terapia (HAMMER, 1996), propiciando que a mesma seja individualizada (BHIVA, 1997).

No presente estudo, realizado em pacientes submetidos ao primeiro tratamento antirretroviral, verificou-se após o início do tratamento, nos três grupos estudados, diminuição significativa dos níveis plasmáticos de RNA do HIV-1. Contudo, não se constatou efeito aditivo da suplementação de ascorbato e NAC, e também não se verificou diferenças entre ambos os tratamentos, quando comparados com o grupo controle (placebo) (Tabela 1).

O estado crônico de estresse oxidativo, em pacientes soropositivos para HIV, induz a formação de espécies reativas de oxigênio a estimularem a replicação viral por mecanismo depende da ativação de NF- κ B (PEACE; LEAF, 1995; LI-WEBER et al., 2000). Diante disto, vários compostos antioxidantes têm demonstrado atividade antirretroviral *in vitro*, incluindo N-acetil-cisteína, cisteína, glutathiona, ascorbato e vitamina E (STAAL et al., 1990; KALEBIC et al., 1991; HARAKEH; JARIWALLA, 1997). Porém, as altas concentrações exigidas desses antioxidantes para se obter a inibição da replicação viral,

demonstraram precocemente sua fraca atividade antiviral (PEACE; LEAF, 1995; ISRAEL; GOUGEROT-POCIDALO, 1997).

Nossos resultados corroboram os resultados de Look e colaboradores (1998), que usaram uma dose de 1800 mg/dia de NAC e 500 µg/dia de selênio, e que, também não verificaram qualquer efeito terapêutico da suplementação com NAC, no sentido de induzir a diminuição da carga viral de pacientes infectados pelo HIV. Em outro estudo, realizado por Breitzkreutz e colaboradores (2000) em pacientes HIV suplementados com NAC em doses variadas (0,6g/dia a 3,2 g/dia), também não se verificou qualquer efeito sobre a carga viral, decorrente da suplementação com doses variadas de NAC, em pacientes com contagem de linfócitos CD4+ entre 200 e 500 células/mm³.

No que se refere à suplementação com ascorbato, estudo realizado por Muller e colaboradores (2000), também não mostra uma inibição significativa da replicação viral em relação ao grupo placebo, porém estes resultados referem-se a um estudo de apenas 13 dias de suplementação. No entanto, Allard e colaboradores (1998a), em estudo realizado com 49 pacientes HIV+ suplementados com 1000 mg/dia de ascorbato e 800 IU/dia de α-tocoferol por um período de 90 dias, obtiveram resultados diferentes daqueles aqui obtidos, ao demonstrar significativa diferença na inibição da replicação viral em relação ao grupo placebo.

A ausência de efeito benéfico em relação à carga viral verificada no presente estudo, para ambos os grupos suplementados, pode ser decorrente diretamente da má absorção ou da ingestão de doses diárias insuficientes de NAC, incapaz de promover a recomposição dos níveis plasmáticos de cisteína e glutathiona, ou da incapacidade da absorção e/ou manutenção de níveis plasmáticos de ascorbato em nossos pacientes, por estes apresentarem, no geral, baixa ingestão de outros elementos essenciais da dieta, como a vitamina E, o que poderia levar a um rápido consumo de ascorbato, seja pela promoção da reciclagem redox, seja pela inativação de radicais livres (ROMERO; ROCHE, 1998).

Estudos foram realizados para caracterizar os efeitos diretos e indiretos relacionados às anormalidades gastrointestinais conseqüentes da infecção pelo HIV (MILLER et al., 1988; TANOWITZ et al., 1996). Estas anormalidades, caracterizadas por atrofia tecidual, má absorção, diarréia e doenças

oportunistas, afetam a absorção de nutrientes ingeridos, provenientes das refeições, como também prejudicam no tratamento da infecção, dificultando a absorção de vários tipos de fármacos, como antirretrovirais, antibióticos e antiparasitários. (ANTONY et al., 1988; GREENSOM et al., 1991; TANOWITZ et al., 1996)

A suplementação de ascorbato associado ao NAC também tem sido alvo de alguns estudos, que mostram um efeito sinérgico na inibição da replicação viral, sinalizando que o ascorbato potencializa o efeito antioxidante da NAC (MEISTER, 1994a; MEISTER, 1994b). Porém, dados de estudo *in vitro* sugerem que concentrações relativamente altas de NAC são necessárias para inibição da replicação viral e, com isso, altas doses de NAC teriam de ser empregadas para alcançar uma eficiente inibição da replicação viral *in vivo* (BERGAMINI et al., 1994; MULLER et al., 2000).

É importante ressaltar que três pacientes do grupo NAC, um paciente do grupo controle e um paciente do grupo ascorbato, apresentaram aumento expressivo da carga viral durante o período de estudo. Estes pacientes submeteram-se às novas determinações do RNA do HIV, onde verificou-se a redução da carga viral sem que fosse necessária a modificação da combinação de fármacos da terapia antirretroviral (Anexo 3, Quadro 5).

Este aumento expressivo do número de cópias do RNA do HIV em pacientes submetidos à terapia antirretroviral, poderia ser caracterizado como resistência viral aos medicamentos, que pode ocorrer por falta de aderência do paciente à terapia, ou por ocorrência natural (VERONESI; FOCACCIA; LOMAR, 2000).

6.2. LINFÓCITOS CD4+, LINFÓCITOS CD8+ E RELAÇÃO CD4/CD8

A característica imunodeficiência verificada na progressão da infecção pelo HIV, decorre de alterações no controle do ciclo celular, observadas em linfócitos de pacientes infectados pelo HIV que apresentam replicação viral ativa (CANNAVO et al., 2001).

A efetiva inibição da replicação viral condicionada ao uso da terapia antirretroviral, objetiva a manutenção do sistema imunológico, no sentido de que este seja novamente reconstituído, o que pode ser avaliado pelo número de linfócitos CD4+, CD8+ e pela relação CD4/CD8.

Neste estudo, foi observado um aumento significativo do número de linfócitos CD4+ após 60 dias em todos os grupos em estudo, entretanto, não se verificou efeito benéfico adicional nos grupos que fizeram uso da suplementação com ascorbato e NAC, como também não se observou diferença significativa quando realizada a comparação entre ascorbato e NAC (Figura 12).

A relação CD4/CD8 (Figura 14) obteve o mesmo perfil em todos os grupos, onde aos 60 dias de terapia apresentou um significativo aumento, decorrente diretamente do aumento do número de linfócitos CD4+. Já a análise do parâmetro CD8, mostrou que o número de linfócitos CD8+ manteve-se estatisticamente inalterado durante todo o período de estudo (Figura 13).

Estudos realizados por Pakker e colaboradores (1998), que avaliaram pacientes submetidos à terapia antirretroviral tripla, e por Smith e colaboradores (2003), que avaliaram pacientes submetidos à terapia antirretroviral altamente ativa (HAART), confirmaram os presentes resultados, ao verificarem um aumento abrupto de linfócitos CD4+ após o início da terapia antirretroviral, seguido de uma estabilização ou lento aumento nessas células com a continuidade da terapia.

Jaruga e colaboradores (2002), realizaram estudo em pacientes submetidos a HAART e suplementados com vitamina C, A e E, e verificaram aumento no número de linfócitos, porém, não se caracterizou efeito adicional no número de linfócitos CD4+ naqueles pacientes que receberam suplementação com estas vitaminas, em relação ao grupo placebo. Anteriormente, Akerlund e colaboradores (1996), suplementando pacientes assintomáticos com 800 mg/dia de NAC, verificaram um aumento na preservação do número de linfócitos CD4+. Resultado interessante foi obtido por Breitskreutz e colaboradores (2000), ao demonstrar que, apesar de não ter ocorrido efeito benéfico adicional da suplementação com NAC em pacientes HIV positivos, ocorreu um aumento da atividade *natural killer* nas células destes pacientes. Assim, a suplementação com NAC em pacientes portadores de HIV foi relevante, uma vez que a diminuição da reatividade imunológica pode ser revertida, apesar de não ter sido verificado aumento do número de linfócitos CD4+.

O aumento do número de linfócitos CD4+ observado no presente trabalho e em muitos outros estudos, poderia ser resultante da diminuição dos níveis plasmáticos do RNA do HIV, e conseqüentemente, da redução do efeito citopático sobre os linfócitos CD4+ decorrentes da infecção pelo HIV, como rompimento da membrana celular (PANTALEO et al., 1993), alteração da homeostase e inibição da síntese de proteínas celular após infecção da célula (GARRY et al.; 1989; ROSENBERG; FAUCI, 1991), e alteração na produção de segundos mensageiros (CRISE; ROSE, 1992).

Entretanto, estudos recentes têm caracterizado que a depleção de linfócitos CD4+ periféricos na infecção pelo HIV, não é somente resultado da ação citopática direta do vírus em células infectadas, mas principalmente decorrente de mecanismos indiretos que levam à apoptose de células não infectadas (GOUGEON; MONTAGNIER, 1999; RASOLA et al., 2001; VLAHAKIS et al., 2001).

Dentre os mecanismos envolvidos associados à apoptose na infecção pelo HIV-1, estaria a participação das EROs (KRAMER, 2000), a ação das proteínas de origem viral, como Tat (LI-WEBER et al., 2000), gp 120 (RADRIZZANI et al., 1997; LI-WEBER et al., 2000), Nef (RASOLA et al., 2001) e vpu (CASELLA et al., 1999). Estas proteínas virais sensibilizam as células CD4+ quanto à apoptose. Dentre os mecanismos mais envolvidos, estaria a geração de um estado pró-oxidante, a ativação de fatores de transcrição sensíveis a este estado redox, como NF- κ B e AP-1, que aumentam a expressão de CD95L, e com isso, leva ao aumento da apoptose mediada por Fas (BADLEY et al., 2000).

6.3. LINFÓCITOS VIVOS, EM APOPTOSE E MORTOS

A avaliação da viabilidade celular de linfócitos circulantes do sangue periférico, caracterizado pela análise percentual de linfócitos vivos, em apoptose e mortos, apresentou resultados significantes apenas para o grupo suplementado com ascorbato, quando avaliado o fator tratamento ao longo do tempo (Figuras 15, 16 e 17).

O percentual de linfócitos vivos foi significativamente diferente em todos os grupos, quando avaliado o tempo de tratamento, a partir de 60 dias de terapia. O grupo ascorbato e o grupo controle evidenciaram uma tendência de

crescimento que se seguiu até o fim do estudo (180 dias). Já o grupo NAC apresentou diferença significativa apenas aos 120 e 180 dias em relação à média basal e a 60 dias de tratamento (Figura 15, Tabela 5).

Os resultados obtidos no grupo ascorbato foram significativamente diferentes dos obtidos no grupo controle e NAC, e caracterizou um benefício de sua suplementação, ao permitir um maior acréscimo no percentual de linfócitos vivos durante todo o tratamento. É importante ressaltar que este evidente acréscimo ocorrido aos 60 e 120 dias de terapia, não acompanhou o aumento do número de linfócitos CD4+, que se estabilizou aos 120 e 180 dias de tratamento (Figura 15).

Concretamente, a diminuição significativa no percentual de linfócitos em apoptose (Figura 16), permitiu um melhor entendimento do benefício da suplementação com ascorbato, ao demonstrar uma queda proporcional de seu percentual. Ambos os parâmetros, linfócitos vivos e em apoptose, apresentaram uma estabilização de suas médias aos 120 e 180 dias de terapia.

Estudo realizado por Jonhson e Parkin (1998), avaliando pacientes submetidos apenas à terapia antirretroviral, verificou uma diminuição nos níveis de linfócitos em apoptose, e aumento do número de linfócitos CD4+, entre 4 e 6 semanas de estudo, seguido posteriormente de uma estabilização de seus níveis. Também Chavan e colaboradores (1999), observaram queda nos níveis de apoptose e aumento do número de linfócitos CD4+, principalmente no início da terapia antirretroviral, e que este efeito se correlacionava significativamente à inibição da expressão do receptor Fas nos linfócitos CD4, porém, não nos linfócitos CD8+.

Estes resultados justificam o conceito de que o abrupto aumento de linfócitos CD4+ no sangue periférico de pacientes infectados pelo HIV, nas primeiras semanas de terapia antirretroviral, deve-se à redistribuição dessas células a partir dos órgãos linfóides secundários (PAKKER et al., 1998), e que aumentos posteriores dependem da restauração da função tímica (TEIXEIRA et al., 2001).

Resultados obtidos por Roger e colaboradores (1999), demonstraram que a apoptose de linfócitos CD4+ em pacientes HIV+, ocorre em menor extensão quando do uso da TARV, e que esta inibição parece ser independente da

viremia plasmática. Contudo, os resultados verificados por Gougeon (1995) e Katsikis (1995), demonstraram níveis elevados de apoptose em pacientes em estágios mais avançados da infecção, já com AIDS. Todos estes achados vêm corroborar a hipótese de que a apoptose é um fator preponderante na depleção de linfócitos CD4+. Desta maneira, estudos em pacientes HIV+ suplementados com compostos antioxidantes (ascorbato, vitamina E, etc.), que alcançam um maior percentual de linfócitos vivos associados a um menor percentual de linfócitos em apoptose, vêm acentuar o papel do estresse oxidativo na indução da apoptose.

O estudo realizado por Jaruga e colaboradores (2002) confirmam estas observações, ao demonstrar que a suplementação com ascorbato e vitamina E em pacientes HIV+ por um período de seis meses, diminuíram o dano oxidativo ao DNA de linfócitos circulantes, o que, segundo os autores, poderia contribuir para a diminuição da morte celular por apoptose nesses pacientes.

Como citado anteriormente no item 6.2, os mecanismos associados à apoptose na infecção pelo HIV-1, envolvem a participação de proteínas virais que sensibilizam linfócitos CD4+ quanto à apoptose, e EROs resultantes do estresse oxidativo, que geram um estado pró-oxidativo ativador de fatores de transcrição como NF- κ B e AP-1, sensíveis ao estado redox.

A suplementação com ascorbato, considerado depois da glutathione, o maior antioxidante solúvel e o primeiro a atuar na defesa contra EROs no sangue (NIKI et al., 1988; NIKI et al., 1995) e no plasma (FREI; ENGLAND; AMES, 1989), e os resultados obtidos para os parâmetros linfócitos vivos e em apoptose, os quais caracterizaram benefícios com a sua suplementação, poderia estar diretamente ligados à sua capacidade de atuar como scavenger de EROs, e também a sua capacidade de regenerar a vitamina E, considerado o mais potente e mais abundante antioxidante lipofílico *in vivo* e presente nas membranas de linfócitos e na maior parte das células do organismo (BURTON, JOYCE; INGOLD, 1983; MEYDANE; BEHARKA, 1996).

Assim, a ação scavenger sobre EROs e/ou recicladora de vitamina E, poderia estar inibindo a ativação de NF- κ B e AP-1, induzindo uma diminuição na expressão de RNAm de CD95L (FasL), com conseqüente diminuição na apoptose mediada por Fas (CD95). A inibição da ativação do NF- κ B também

impede a expressão e replicação do HIV-1 (SCHRECK; RIEBER; BAEUERLE, 1991; WONG et al., 1991).

Em relação ao percentual de linfócitos mortos, nenhum grupo apresentou diferença significativa no tratamento ao longo do tempo. O grupo NAC teve suas médias significativamente diminuídas ao longo do tempo de estudo apenas aos 180 dias, enquanto o grupo controle apresentou oscilação em suas médias aos 60, 120 e 180 dias. Já o grupo ascorbato, permaneceu sem diferenças significativas durante todo o período de avaliação (180 dias) (Figura 18).

6.4. GLOBULINAS, IgA, IgG, IgM E β -2 MICROGLOBULINA

Estudos têm evidenciado que os valores da IgA na infecção pelo HIV-1, servem como prognóstico, ao demonstrarem que níveis séricos elevados dessa imunoglobulina indicam de maneira independente (PASCALLE et al., 1997; SABIN, et al., 1998), ou associada à CD4+ (MONTELLA et al., 1997), uma maior propensão para AIDS. Outros estudos sugerem que a IgA não fornece informações adicionais importantes sobre a progressão da infecção pelo HIV, sendo útil apenas como controle para a determinação de linfócitos CD4+ (ALCABES et al., 1994; ULLUM et al., 2000).

A IgG nos grupos controle, ascorbato e NAC exibiu médias aos 60 dias, significativamente menores que os valores de média basal, sendo que aos 120 e 180 dias, as médias mantiveram-se sem diferença significativa. Contudo, nenhum dos grupos conseguiu restabelecer os valores de referência, tendo o grupo ascorbato apresentado, como as demais imunoglobulinas, uma tendência de queda observada até o fim do estudo (Figura 20, Tabela 10).

Os valores basais aumentados da IgA (Figura 19, Tabela 9) e IgG (Figura 20, Tabela 10) observados em nosso estudo, poderim ser atribuídos à ativação policlonal dos linfócitos B decorrente do aumento dos níveis séricos de citocinas como $\text{TNF}\alpha$, em resposta a uma ativação crônica do sistema imune (MACCHIA et al., 1993), ou ao aparecimento de uma sub-população de linfócitos B, que expressam níveis de CD21, em pacientes que apresentaram altos níveis de viremia (MOIR et al., 2001), característica apresentada por pacientes no presente estudo.

Apesar desta relação entre a infecção pelo HIV e a ativação de linfócitos B, os níveis séricos das globulinas e imunoglobulinas, principalmente IgG, permanecem como marcadores pouco confiáveis da evolução da infecção pelo HIV, após o início da terapia antirretroviral. Os níveis séricos de IgA e IgM, também mostraram ser marcadores menos confiáveis que o parâmetro carga viral, para avaliar a evolução da infecção após o início da terapia, visto que refletem apenas o estado de ativação das células do sistema imune celular e imune humoral, decorrente da infecção dos linfócitos CD4+ pelo HIV e do conseqüente aumento da produção de citocinas como o TNF- α .

No presente estudo, os resultados do efeito da terapia antirretroviral sobre a hipergamaglobulinemia, foram semelhantes aos obtidos por Notermans e colaboradores (2001) e Jacobson e colaboradores (2002), que evidenciaram um declínio nos níveis séricos das imunoglobulinas, principalmente IgG, após início da terapia antirretroviral, sem diminuições significativas ao decorrer do tempo de tratamento.

Os presentes resultados demonstraram que o grupo ascorbato manteve uma tendência de diminuição de seus valores de imunoglobulinas até o fim do estudo, sugerindo que o ascorbato exerceu um efeito sobre o ritmo de progressão da infecção pelo HIV, diferentemente do grupo NAC, que em nenhum momento do estudo caracterizou alguma diferença para os parâmetros avaliados. Isso leva a crer que estudos futuros, que avaliassem os efeitos da suplementação com ascorbato em pacientes soropositivos para o HIV-1, conduzidos por período de tempo mais prolongado, poderiam fornecer resultados mais consistentes sobre o efeito da suplementação com ascorbato. Com isso, o objetivo seria de acompanhar até que ponto é possível restabelecer um valor de IgG e manter os níveis de IgA e IgM junto aos valores de referência. Ainda seria desejável, estabelecer protocolos de estudo que avaliassem este efeito sobre os órgãos linfóides secundários.

Os níveis séricos de β -2 Microglobulina dos grupos controle, ascorbato e NAC, apresentaram diminuição significativa em conseqüência da terapia antirretroviral a que foram submetidos, quando considerado o fator tempo. Essa diferença foi observada aos 60 dias de tratamento, sendo que apenas os grupos ascorbato e NAC apresentaram diferenças significativas ao fim de 180 dias, em relação às médias basais e, 60 e 120 dias de tratamento. O grupo

controle permaneceu sem alterações após a diferença obtida aos 60 dias de terapia. Vale ressaltar que o grupo ascorbato apresentou uma diferença significativa quanto ao fator tratamento, com uma evidente queda nos níveis de β -2 microglobulina (Figura 22).

A β -2-microglobulina é uma proteína de baixo peso molecular, que forma os antígenos de cadeia leve constante de classe 1 do MHC, presentes na superfície da maioria das células somáticas (SHI et al., 1997). Os níveis séricos da β -2-microglobulina aumentam em consequência da ativação imunológica e da destruição de células linfóides (HOFMANN et al., 1990; HOFMANN, et al., 1992), e apresentam significativa capacidade de prognosticar a evolução da infecção pelo HIV para AIDS, independentemente do número de linfócitos CD4+ no sangue (PASCALE et al., 1997).

A diminuição dos níveis séricos obtida em todos os grupos em estudo, e mais evidentemente no grupo ascorbato, poderia ser atribuída à eficiência da terapia antirretroviral, que reduz os níveis de RNA do HIV (OGG et al., 1998), dos genes Tat e Vpr, e das proteínas virais gp 160 e gp 120 (ROUX et al., 2000; MAHIEUX et al., 2001). A diferença obtida apenas pelo grupo ascorbato quando avaliado o fator tratamento, poderia estar relacionada à capacidade do ascorbato em reciclar a glutathiona, que também recicla o ascorbato, mantendo com isso os níveis intracelulares de glutathiona. A manutenção dos níveis de glutathiona permitiria o equilíbrio do estado redox intracelular dos linfócitos CD4+ (MEISTER, 1994a; MEISTER, 1994b). Outra hipótese está na capacidade do ascorbato em regenerar a vitamina E presente na membrana dos linfócitos, durante o processo de estresse oxidativo, mantendo com isso sua integridade (NIKI et al., 1995; MEYDANE; BEHARKA, 1996). O resultado final desta defesa antioxidante pela ação do ascorbato, reciclando glutathiona e vitamina E, permitiria séricos diminuídos de β -2-microglobulina.

Alguns autores consideram que níveis séricos elevados de β -2-microglobulina são, ainda, altamente preditivos para a diminuição subsequente do número de linfócitos CD4+ (SCHWATSLANDER et al., 1993; ASHTON et al., 1998).

7. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo permitem concluir que:

- A terapia antirretroviral inibiu de maneira efetiva a replicação viral, com conseqüente diminuição dos níveis plasmáticos de RNA do HIV-1, que foi acompanhada pelo aumento do número de linfócitos CD4+, da relação CD4/CD8, da viabilidade de linfócitos, e da diminuição dos níveis de globulinas, IgA, IgG, IgM e β -2 microglobulina, no geral, de acordo com os dados existentes na literatura.
- A suplementação com NAC não apresentou efeito benéfico adicional à terapia antirretroviral, para os parâmetros propostos avaliados, na dose de 600 mg/dia. Por outro lado, houve uma diferença significativa da suplementação de ascorbato, na dose de 2 g/dia, em relação ao grupo NAC e placebo, quando avaliado o tratamento ao longo do tempo, para os parâmetros linfócitos vivos e linfócitos mortos, independente da terapia antirretroviral, reforçando seu efeito terapêutico.
- O grupo suplementado com ascorbato, apresentou também uma diminuição significativa dos níveis de β -2 microglobulina, quando avaliado o fator tratamento, o que poderia ser característico da maior manutenção da integridade de linfócitos circulantes do sangue periférico, sugerindo a indicação desta globulina, como um biomarcador da progressão da AIDS.
- Pode-se concluir que pacientes submetidos à terapia antirretroviral e suplementados com ascorbato, apresentaram um efeito benéfico na reconstituição do sistema imune, ao ter propiciado aumento da viabilidade de linfócitos, sendo, em conseqüência, possível recomenda-lo no tratamento da AIDS.

8. PERSPECTIVAS

- Estudar a suplementação de vitamina C, associada à vitamina E, e/ou outros antioxidantes como alguns polifenóis, em um protocolo de estudo com período de avaliação igual ou superior a um ano.
- Concomitantemente, acompanhar os biomarcadores de progressão da doença, especificamente a β -2 microglobulina, por um período de estudo igual ou superior a um ano.
- Também, monitorar a GSH e a atividade da glutathiona reduzida (GR) nos eritrócitos.
- Ainda, seguindo o mesmo protocolo de estudo, avaliar os níveis séricos de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H., POBER, J.S. **Imunologia Celular e Molecular**. 4 ed. Rio de Janeiro (RJ): Ed. Revinter, 544p, 2003.

AIDS: etiologia, clínica, diagnóstico e tratamento. <http://www.aids.gov.br>. Acessado via net em Agosto de 2004.

AKERLUND, B., JARSTRAND, C., LINDEKE, B., et al. Effect of N-acetylcysteine (NAC) treatment on HIV-1 infection: a double-blind placebo-controlled trial. **Eur. J. Clin. Pharm.**, Berlin, v.50, n.6, p.457-461, 1996.

ALCABES, P., SELWYN, P.A., DAVENNY, K., et al. Laboratory markers and the risk of developing HIV-1 disease among injecting drug users. **AIDS**, London, v.8, n.1, p.107-115, 1994.

ALLARD, J.P., AGHDASSI, E., CHAU, J., et al. Effects of vitamin E e C supplementation on oxidative stress and viral load in HIV-infected subjects. **AIDS**, n.12, p.1653-1659, 1998a.

ALLARD, J.P., AGHDASSI, E., CHAU, J., et al. Oxidative stress and plasma antioxidant micronutrients in human with HIV infection. **Am. J. Clin. Nutr.**, n.67, p. 143-147, 1998b.

ALTFELD, M., ROSENBERG, E.S., SHANKARAPPA, R., et al. Cellular immune responses and viral diversity in individuals treated during acute and early HIV-1 infection. **J. Exp. Med.**, v.193, n.2, p.169-180, 2001.

ANTONY, M.A., BRANDT, L.J., KLEIN R.S, et al. Infectious diarrhea in patients with AIDS. **Dig. Dis. Sci.**, v.33, p.1141-1146, 1988.

ASHTON, L.J., CARR, A., CUNNINGHAM, P.H., et al. Predictors of progression in long-term nonprogressors. Australian Long-Term Nonprogressor Study Group. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, New York, v.14, n.2, p.117-121, 1998.

AUKRUST, P., MULLER, F., FROLAND, S.S. Elevated serum levels of IL-4 and IL-6 in patients with common variable immunodeficiency (CVI) are associated with chronic immune activation and low numbers of CD4+ lymphocytes. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, v.70, n.3, p.217-224, 1994.

BADLEY, A.D., PILON, A.A., LANDAY, A., LYNCH, D.H. Mechanism of HIV-associated lymphocyte apoptosis. **Blood**, n.96, p.2951-2964, 2000.

BAEUERLE, P.A., BALTIMORE, D. NF- κ B: ten years after. **Cell**, v.84, p.853-862, 1996.

BAEUERLE, P.A., HENKEL, T. Function and activation of NF- κ B in the immune system. **Annu. Rev. Immunol.**, n.12, p.141-149, 1994.

BAGGIOLINI, M. Chemokines and leukocyte traffic. **Nature**, n.392, p.565-568, 1998.

BALDWIN, A.S. The NF- κ B and I- κ B proteins: New discoveries and insights. **Annu. Rev. Immunol.**, v.14, p.649-683, 1996.

BARRE-SINOUSSE, F., CHERMANN, J.C., REY, F., et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science**, v.220, n.4599, p.868-871, 1983.

BECKMAN INSTRUMENTS INCORPORATION. **Immunoglobulin A**. Brea. p.11, 1996. Manual Técnico.

BECKMAN INSTRUMENTS INCORPORATION. **Immunoglobulin G**. Brea. p.11, 1996a. Manual Técnico.

BECKMAN INSTRUMENTS INCORPORATION. **Immunoglobulin M**. Brea. p.11, 1996b. Manual Técnico.

BEER, B.E., BAILES, E., SHARP, P.M., HIRSCH, V.M. Diversity and Evolution of Primate Lentiviruses, 1999. <http://www.hiv-web.lanl.gov/compendium>. Acessado em Setembro de 2004.

BERGAMINI, A., CAPOZZI, M., GHIBELLI, L., et al. Cystamine potently suppresses in vitro HIV replication in acutely and chronically infected human cells. **J. Clin. Invest.**, v.93, p.2251-2257, 1994.

BEUTLER, E. Nutritional and metabolic aspects of glutathione. **Annu. Rev. Nutr.**, Palo Alto, v.9, p.287-302, 1989.

BHIVA. GUIDELINES COORDINATING COMMITTEE. British HIV Association guidelines for antiretroviral treatment of HIV seropositive individuals. **Lancet**, London, v.349, n.9058, p.1086-1092, 1997.

BLATTNER, W. A. HIV epidemiology: past, present, and future. **FASEB J.**, v. 5, n.10, p. 2340-2348, 1991.

BOSSI, G., GRIFFITHS, G.M. Degranulation plays an essential part in regulation cell surface expression of Fas ligand in T cells and natural killer cells. **Nat. Med.**, n.50, p.90, 1999.

BOWIE, A.G., O'NEIL, L.A. Vitamin C inhibits NF- κ B activation via the activation of p38 mitogen-activated protein kinase. **J. Immunol.**, v.165, n.12, p.7180-7188, 2000.

BOWRY, V.W., MOHR, D., CLEARY, J., STOCKER, R. Prevention of tocopherol-mediated peroxidations in ubiquinol-10-free human low density lipoprotein. **J. Biol. Chem.**, n.270, p.5756-5763, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Coordenação Nacional de DST/AIDS. Boletim Epidemiológico – AIDS, Ano XVII, nº 01 – 01ª a 52ª Semanas Epidemiológicas, Janeiro a Dezembro de 2003. Brasília, 2004a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Coordenação Nacional de DST/AIDS. Novo algoritmo do diagnóstico da infecção pelo HIV e programa de controle de Qualidade Analítica do Diagnóstico Laboratorial da infecção pelo HIV. Portaria Nº 59/28-Janeiro/2003. <http://www.aids.gov.br>. Acessado em Agosto/2004b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Coordenação Nacional de DST/AIDS. Boletim Epidemiológico – AIDS, Ano XIII, nº 03 – 36ª à 52ª Semanas Epidemiológicas, Outubro a Dezembro de 2000, 2000.

BREEN, E.C. Pro- and anti-inflammatory cytokines in human immunodeficiency vírus infection and acquired immunodeficiency syndrome. **Pharm. Theraps.**, n.95, p.295-304, 2002.

BREITKREUTZ, R., PITTACK, N., NEBE, C.T., et al. Improvement of immune functions in HIV infection by sulfur supplementation: two randomized trials. **J. Mol. Med.**, v.78, n.1, p.55-62, 2000.

BRODIE, S., LEWINSOHN, D., PATTERSON, B. K., et al. In vivo migration and function of transferred HIV-1 specific cytotoxic T cells. **Nat. Med.**, n.5, p.34-41, 1999.

BUDIARDJO, I., OLIVER, H., LUTTER, M., et al. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v.15, n.269-290, 1999.

BULGER, E.M., MAIER, R.V. Antioxidants in critical illness. **Arch. Surg.**, n.136, p.1201-1207, 2001.

BULGER, E.M., HELTON, W.S. Nutrient antioxidants in gastrointestinal diseases. **Gastroenterol. Clin. North Am.**, v.27, n.2, p.403-149, 1998.

BUETTNER, G.R. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. **Arch. Biochem. Biophys.**, n.300, p.535-543, 1993.

BURTON, G.W., JOYCE, A., INGOLD, K.U. Is vitamin E the only lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes? **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 221, p. 281-290, 1983.

CALDERON, E. RAMIREZ, M.A., ARRIETA, M.I., et al. Nutritional disorders in HIV disease. **Prog. Food Nutr. Sci.**, Oxford, v.14, n.4, p.371-402, 1990.

CANNAVO, G., PAIARDINI, M., GALATI, D., et al. Abnormal intracellular kinetics of cell-cycle-dependent proteins in lymphocytes from patients infected with human immunodeficiency virus: a novel biologic link between immune activation, accelerated T-cell turnover, and high levels of apoptosis. **Blood**, New York, v.97, n.6, p.1756-1764, 2001.

CARPENTER, C.C., FISCHL, M.A., HAMMER, S.M., et al. Antiretroviral therapy for HIV infection in 1997. Updated recommendations of the International AIDS Society-USA panel. **JAMA**, v.277, n.24, p.1962-1969, 1997.

CARR, A., FREI, B. Does vitamin C is a pro-oxidant under physiological conditions? **FASEB**, n.13, p.1007-1024, 1999.

CASELLA, C.R., RAPAPORT, E.L., VIRGOS, E.M., et al. Vpu increases susceptibility of human immunodeficiency virus type 1-infected cells to Fas killing. **J. Virol.**, v.73, n.1, p.92-100, 1999.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL. AIDS epidemic update: 2004. <http://www.cdc.org>. Acessado em novembro de 2004.

CDC. CENTER FOR DISEASES CONTROL. Guidelines for National Human immunodeficiency virus case surveillance, including monitoring for human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) **MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, v. 48, n.RR-13, p. 1-31, 1999.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. **MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, Atlanta, v.41, n.RR-17, p.1-19, 1992.

CDC. CENTER FOR DISEASES CONTROL. Epidemiologic notes and reports immunodeficiency among female sexual partners of males with acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, v.31, n.52, p. 697-698, 1983.

CDC. CENTER FOR DISEASES CONTROL. Epidemiologic notes and reports update on Kaposi's Sarcoma and opportunistic infections in previously healthy persons – United States. **MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, v.31, n.22, p. 294-301, 1982a.

CDC. CENTER FOR DISEASES CONTROL. Epidemiologic notes and reports Pneumocystis pneumonia among persons with hemophilia A. **MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, v. 31, n.27, p. 365-367, 1982b.

CDC. CENTER FOR DISEASES CONTROL. Epidemiologic notes and reports possible transfusion-associated acquired immune deficiency syndrome (AIDS) - California. **MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, v. 31, n.48, p. 652-654, 1982c.

CDC. CENTER FOR DISEASES CONTROL. Unexplained immunodeficiency and opportunistic infections in infants – New York, New Jersey, California. **MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, v. 31, n.49, p. 665-667, 1982d.

CDC. CENTER FOR DISEASES CONTROL. Pneumocystis pneumonia – Los Angeles. **MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, v. 3, n.21, p. 1-3, 1981a.

CDC. CENTER FOR DISEASES CONTROL. Kaposi's Sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men – New York. **MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, v. 30, n.25, p. 305-308, 1981b.

CHAVAN, S.J., TAMMA, S.L., KAPLAN, M., et al. Reduction in T cell apoptosis in patients with HIV disease following anti-retroviral therapy. **Clin. Immunol.**, v.93, n.1, p.24-33, 1999.

CHEN, G., SHANKAR, P., LANGE, C., et al. CD8+ T cells specific for human immunodeficiency virus, Epstein-Barr virus, and cytomegalovirus lack molecules for homing to lymphoid sites of infection. **Blood**, n.98, p156, 2001.

CHINNAIYAN, A.M., O'ROURKE, K., TEWARI, M., et al. a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. **Cell**, Cambridge, v.81, n.4, p.505-512, 1995.

CHIRMULE, N., PAHWA, S. Envelope glycoproteins of human immunodeficiency virus type 1: profound influences on immune function. **Microbiol.**, n.60, p.386-406, 1996.

CLAVEL, F., BRUN-VEZINET, F., GUETARD, D., et al. LAV type II: a second retrovirus associated with AIDS in West Africa. **C. R. Acad. Sci. III**, v.302, n.13, p.485-488, 1986.

COFFIN, J., HAASE, A., LEVY, J.A., et al. What to call the AIDS virus? **Nature**, v.321, n.6065, p10, 1986.

COHEN, J.J. Apoptosis mechanisms of life and death in immune system. **The J. Allergy Clin. Immunol.**, v.103, n.4, p.548-554, 1999.

COLLIER, L., OXFORD, J. **Retroviruses and AIDS**. In: Collier, L. & Oxford, J. (eds) Human Virology, 1^a edição, Oxford:Oxford University Press, p.281-205, 1993.

CRISE, B., BUONOCORE, L., ROSE, J.K. CD4 is retained in the endoplasmic reticulum by the human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein precursor. **J. Virol.**, v.64, n.11, p.5585-5593, 1990.

CURRIE, A.R., KERR, J.F., WYLLIE, A.H. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer**, v. 26, n.4, p.239-257, 1972.

DARMAY, B.G., AGGARRWAL, B.B. Early events in TNF signaling: a story of associations and dissociations. **J. Leukoc. Biol.**, n.61, p.559-566, 1997.

DAUGAS, E., SUSIN, S.A., ZAMZAMI, N., et al. Mitochondrio-nuclear redistribution of AIF in apoptosis and necrosis. **FASEB**, v.14, p.729-739, 2000.

DE MILITO, A., MORCH, C., SONNENBORG, A., et al. Loss of (CD27) B lymphocytes in HIV infection. **AIDS**, n.15, p.957-964, 2001.

DE ROSA, S.C., ZARETSKY, M.D., DUBS, J.G., et al. N-acetylcysteine replenishes glutathione in HIV infection. **Eur. J. Clin. Invest.**, Berlin, v.30, n.10, p.915-929, 2000.

DHARIWALL, K.R., HARTZELL, W.O., LEVINE, M. Ascorbic acid e dehydroascorbic acid measurements in human plasma and serum. **Am. J. Clin. Nutri.**, n.54, p. 712-716, 1991.

DIMMOCK, N.J., PRIMROSE, S.B. **Introduction to Modern Virology**. Oxford: Blackwell Sci. p.362, 1987.

DOBMEYER, T.S., FINDHAMMER, S., DOBMEYER, J.M., et al. Ex vivo induction of apoptosis in lymphocytes is mediated by oxidative stress: Role for lymphocyte loss in HIV infection. **Free Rad. Biol. Med.**, v.22, n.5, p775-785, 1997.

DRAGIC, T., LITWIN, V., ALLAWAY, G.P., et al. HIV-1 entry into CD4+ cell is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. **Nature**, v.38, n.6584, p.667-673, 1996.

DRÖGE, W., BREITKREUTZ, R. Glutathione and immune function. **Proc. Nut. S.**, London, v. 59, n.4, p.595-600, 2000

ECONOMIDES, A., SCHIMID, I., ANISMAN-POSNER, D.J., et al. Apoptosis in Cord Blood T Lymphocytes from infants of Human Immunodeficiency Virus-infected Mothers, **Clin. Diag. Lab. Immunol.**, v.5, n.2, p.230-234, 1998.

ESSEX, M., KANKI, P.J. The origins on the AIDS virus. In: GALLO, R.C., MONTAGNIER, L., HASELTINE, W.A., WONG-STAAAL, F., ESSEX, M., KANKI, J.P., HEYWARD, W.L., CURRAN, J.W., MANN, J.M., CHIN, J., PIOT, P., QUINN, T., REDFIELD, R.R., BURKE, D.S., WEBER, J.N., WEISS, R.A., YARCHOAN, R., MITSUYA, H., BRODER, S., MATTHEWS, T.J., BOLOGNESI, D.P., FINEBERG, H.V., THOMAS, L., eds. **The Science of AIDS**. New York: W. H. Freeman, p.27-28, 1989.

ESTAQUIER, J., ARNOULT, D., PETIT, F., et al. Mitochondria in HIV-1. induced apoptosis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, n.304, p561-574, 2003.

EVANS, P., HALLIWELL, B. Micronutrients:oxidant/antioxidant status. **Br. J. Nutr.**, n.85, (S2): p. S67-S74, 2001.

FARTHING, C.F., BROWN, S.E., STAUGHTON, R.C.D. Atlas colorido de AIDS e da doença do HIV. São Paulo: Artes Médicas, 103p., 1989.

FAUCI,A.S., PANTALEO,G., STANLEY, S., et al. Immunopathogenic mechanisms of HIV infection. **Ann. Intern. Med.**, v.124, n.7, p-654-663, 1996.

FAUCI, A.S. The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis. **Science**, v.239, n.4840, p.617-622, 1988.

FINZI, D., SILICIANO, R.F. Vial dynamics in HIV-1 infection. **Cell**, n.93, p.665-671, 1998.

FLAMAND, L., CROWLEY, R.W., COLOMBINI-HATCH, S., MARGOLIS, D.M., GALLO, R.C. Activation of CD8+ T lymphocytes through the cell receptor turns on CD4+ gene expression implications for HIV patogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, n.95, p.3111-3116, 1998.

FOLEY, B.T. An overview of the molecular phylogeny of lentiviruses. **Los Alamos National laboratory**, Los Alamos, 2000.

FREI, B., STOCKER, R., ENGLAND, L., AMES, B.N. Ascorbate: the most effective antioxidant in human blood plasma. **Adv. Exp. Med. Biol.**, n.264, p.155-163, 1990.

FREI, B., ENGLAND, L., AMES, B.N. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, n. 86, p. 6377-6381, 1989.

FRIEDLAND, G.H., KLEIN, R.S. Transmission of the human immunodeficiency virus. **N. Engl. J. Med.**, v.317, n.18, p.1125-1135, 1987.

FUJIKAWA, L.S., SALAHUDDIN, S.Z., PALESTINE, A.G., et al. Isolation of human T-lymphotropic virus type III from the tears of a patient with the acquired immunodeficiency syndrome. **Lancet**, v.2, n.8454, p.529-530, 1985.

GALLO, R.C., SALAHUDDIN, S.Z., POPOVIC, M., et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. **Science**, v.224, n.4648, p.500-503, 1984.

GALLO, R.C., SARIN, P.S., GELMANN, E.P., et al. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science**, v.220, n.4599, p.865-867, 1983.

GAMANDIA, L.E., RENTENAAR, R.J., REMMERSWAAL, E.B., et al. CMV-specific CD8 (pos) T lymphocyte differentiation in latent CMV infection. **Transplant. Proc.**, n.33, p.1802, 2001.

GAO, F., BAILES, E., ROBERTSON, D.L., et al. Origin of HIV in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. **Nature**, n.396, p.437-442, 1999.

GARRY, R.F. Potential mechanisms for the cytopathic properties of HIV. **AIDS**, London, v.3, n.11 p.683-694, 1989.

GOUGEON, M.L., MONTAGNIER, L. Programmed cell death as a mechanism of CD4 and CD8 T cell deletion in AIDS: Molecular Control and Effect of Highly Active Anti-retroviral Therapy. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.887, p.199-212, 1999.

GOUGEON, M. L., LECOEUR, H., DULIOUST, A., et al. Programmed cell death in peripheral lymphocytes from HIV-infected persons. **J. Immunol.** 156: 3509-3514. 1995.

GOUGEON, M.L., MONTAGNIER, L. Apoptosis in AIDS. **Science**, n.260, p.1269-1270, 1993.

GREENE, W.C. AIDS and the immune system. **Sci. Am.**, v.269, n.3, p.98-105, 1993.

GREENSON, K., BELITSOS, P.C., YARDLEY, J.H., et al. AIDS enteropathy: Occult enteric infections and duodenal mucosal alterations in chronic diarrhea. **Ann. Intern. Med.**, v,114, p.366-372, 1991.

GREZ, M., DIETRICH, U., BALFE, P., et al. Genetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 and 2 (HIV-1 and HIV-2) mixed infections in India reveals a recent spread of HIV-1 and HIV-2 from a single ancestor for each of the viruses. **J. Virol.**, n.68, p. 2161-2168, 1994.

GROOPMAN, J.E., SALAHUDDIN, S.Z., SARNGADHARAN, M.G., MARKHAM, P.D., GONDA, M., SLISKI, A., GALLO, R.C. HTLV-III in saliva of people with AIDS-related complex and healthy homosexual men at risk for AIDS. **Science**, v.226, p.447-449, 1984.

HAHN, B.H., SHAW, G.M., DE COCK, K.M., et al. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. **Science**, n. 287, p.607-614, 2000.

HALLIWELL, B. Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant in vivo? **Free Radic. Res.**, v.25, n.5, p.439-454, 1996.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford: Oxford University Press, 2nd edition, p.1-267, 1989.

HAMMER, S.M. Advances in antiretroviral therapy and viral load monitoring. **AIDS**, London, v.10, Suppl. 3, p.1-11, 1996.

HARAKEH, S., JARIWALLA, R.J. NF- κ B independent suppression of HIV expression by ascorbic acid. **AIDS Res. Human Retrov.**, v.13, n.3, p.235-239, 1997.

HARAKEH, S., JARIWALLA, R.J. Ascorbate effect on cytokine stimulation of HIV production. **Nutrition**, v.11, n.5, p.684-687, 1995.

HARAKEH, S., JARIWALLA, R.J. Comparative study of the anti-HIV activities of ascorbate and thiol-containing reducing agents in chronically HIV-infected cells. **Am. J. Clin. Nutr.**, n. 54 (S-6), p.1231S-1235S, 1991.

HARAKEH, S., JARIWALLA, R.J., PAULING, L. Suppression of human immunodeficiency virus replication by ascorbate in chronically and acutely infected cells. **Proct. Natl. Acad. Sci. USA**, n.80, p. 7245-7249, 1990.

HASELTINE, W.A. Molecular biology of the human immunodeficiency virus type 1. **FASEB**, n.5, p.2349-2360, 1991.

HASELTINE, W.A., WONG-STAAAL, F. The molecular biology of the AIDS virus. **The Science of AIDS**. W. H. Freeman, p.13-26, 1989.

HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v.407, p.770-776, 2000.

HERNDIER, B.G., KAPLAN, L.D., McGRATH, M.S. Pathogenesis of AIDS lymphomas. **AIDS**, v.8, p.1025-1049, 1994.

HO, D.D., ROTA, T.R., SCHOOLEY, R.T., et al. Isolation of HTLV-III from cerebrospinal fluid and neural tissues of patients with neurologic syndromes related to the acquired immunodeficiency syndrome. **N. Engl. J. Med.**, v.313, n.24, p.1493-1497, 1985.

HO, D.D., BYINGTON, R.E., SCHOOLEY, R.T., et al. Infrequency of isolation of HTLV-III virus from saliva in AIDS. **N. Engl. J. Med.**, v.313, n.25, p.1606, 1985a.

HO, D.D., SCHOOLEY, R.T., ROTA, T.R., et al. HTLV-III in the semen and blood of a healthy homosexual man. **Science**, v.226, n.4673, p.451-453, 1984.

HOFMANN, B., BASS, H., NISHANIAN, P., et al. Different lymphoid cell populations produce varied levels of neopterin, beta 2-microglobulin and soluble IL-2 receptor when stimulated with IL-2, interferon-gamma or tumour necrosis factor-alpha. **Clin. Exp. Immunol.**, London, v.88, n.3, p.548-584, 1992.

HOFMANN, B., WANG, Y.X., CUMBERLAND, W.G., et al. Serum beta 2-microglobulin level increases in HIV infection: relation to seroconversion, CD4 T-cell fall and prognosis. **AIDS**, London, v.4, n.3, p.207-214, 1990.

IMAI, Y., KIMURA, T., MURAKAMI, A., et al. The CED-4-homologous protein FLASH is involved in Fas-mediated activation of caspase-8 during apoptosis. **Nature**, v.398, n.6730, p.777-785, 1999.

ISMAIL, N., OLANO, J.P., FENG, H., et al. Current status of immune mechanisms of killing of intracellular microorganisms. **FEMS Microb.**, n.207, p.111-120, 2002.

ISRAEL, N., GOUGEROT-POCIDALO, M. A. Oxidative stress in human immunodeficiency virus infection. **CMLS**, n.53, p.864-870, 1997.

JACOB, R.A., BURRI, B.J. Oxidative damage and defense. **Am. J. Clin. Nutrition**, v.63, p.S985-S990, 1996.

JACOBSON, M. A., KHAYAM-BASHI, H., MARTIN, J.N., et al. Effect of long-term highly active antiretroviral therapy in restoring HIV-induced abnormal B-lymphocyte function. **JAIDS**, v. 31, p.472-477, 2002.

JACOTOT. E., RAVAGNAN, L., LOEFFLER, M., et al. The HIV-1 viral protein R induces apoptosis via a direct effect on the mitochondrial permeability transition pore. **J. Exp. Med.**, v.191, n.1, p. 33-46, 2000.

JAHLOOR, F., GAZZARD, B., PHILLIPS, G., et al. The acute-phase protein response to human immunodeficiency virus infection in human subjects. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v.39, p. E1092-E1098, 1999.

JIALAL, I., GRUNDY, S.M. Preservation of the endogenous antioxidants in low density lipoprotein by ascorbate but not probucol during oxidative modification. **J. Clin. Invest.**, n.87, p. 597-601, 1991.

JARIWALLA, R., HARAKEH, S. **Mechanisms underlying the action of vitamin C in viral and immunodeficiency disease.** In: Vitamin C in Health and Disease, ed. Lester Packer and Jurgen Fuchs, N.Y.: Marcel Dekker, p. 309-322, 1997.

JARIWALLA, R., HARAKEH, S. Antiviral and immunomodulatory activities of ascorbic acid. In: Subcellular Biochemistry, v.25: Ascorbic Acid: Biochemistry and Biomedical Cell Biology, ed. J. Robins Harris, N.Y: Plenum Press, p.215-231, 1996.

JARUGA, P., JARUGA, B., GACKOWSKI, D., et al. Supplementation with antioxidant vitamins prevents oxidative modification of DNA in lymphocytes of HIV-infected patients. **Free Radic. Biol. Med.**, v.32, n.5, p.414-420, 2002.

JOHNSON, N., PARKIN, J.M. Anti-retroviral therapy reverses HIV-associated abnormalities in lymphocyte apoptosis. **Clin. Exp. Immunol.**, London, v.113, n.2, p.229-234, 1998.

KALAMS, S.A., WALKER, B.D. The critical need for CD4 help maintaining effective cytotoxic T lymphocyte responses. **J. Exp. Med.**, n.188, p.2199-2204, 1998.

KALEBIC, T., KINTER, A., POLI, G., et al. Suppression of human immunodeficiency virus expression in chronically infected monocytic cells by glutathione, glutathione ester, and N-acetylcysteine. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.88, p. 986-990, 1991.

KATSIKIS, P.D., WUNDERLICH, E.S., SMITH, C. A., et al. Fas antigen stimulation induces marked apoptosis of T lymphocytes in human immunodeficiency virus-infected individuals. **J. Exp. Med.** 181: 2029-2036. 1995.

KRAMER, P.H. CD95's deadly mission in the immune system. **Nature**, v.407, p.789-795, 2000.

KUIKEN, C., THAKALLAPALLI, R., ESKLID, A., et al. Genetic analysis reveals epidemiologic patterns in the spread of human immunodeficiency virus. **Am. J. Epidemiol.**, v. 152, n. 9, p. 814-822, 2000.

LAPOINTE, N., MICHAUD, J., PEKOVIC, D., et al. Transplacental transmission of HTLV-III virus. **N. Engl. J. Med.**, v.312, n.20, p.1325-1326, 1985.

LEVY, J.A., KAMINSKY, L.S., MORROW, W.J., et al. Infection by the retrovirus associated with the acquired immunodeficiency syndrome. Clinical, biological, and molecular features. **Ann. Intern. Med.**, v.103, n.5, p.694- 699, 1985.

LEVY, J.A., HOFFMAN, A.D., KRAMER, S.M., et al. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. **Science**, v.225, n.4664, p.840-842, 1984.

LI, C.J., FRIEDMAN, D.J., WANG, C., et al. Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein. **Science**, v.268, n.5209, p.429-431, 1995.

LI-WEBER, M., LAUR, O., DERN, K., et al. T cell activation-induced and HIV Tat-enhanced CD95 (APO-1/Fas) ligand transcription involves NF-Kappa B. **Eur. J. Immunol.**, v.30, p.661-670, 2000.

LIFSON, J.D., FEINBERG, M.B., REYES, G.R., et al. Induction of CD4-dependent cell fusion by the HTLV-III/LAV envelope glycoprotein. **Nature**, v.323, n.6090, p.725-728, 1986.

LOOK, M.P., ROCKSTROH, J.K., RAO, G.S., et al. Sodium selenite and N-acetylcysteine in antiretroviral-naive HIV-1-infected patients: a randomized, controlled pilot study. **Eur. J. Clin. Invest.**, v.28, n.5, p.389-397, 1998.

LULIANO, R., FORASTIERI, G., BRIZZI, M., et al. Correlation between plasma HIV-1 RNA levels and the rate of immunologic decline. **J. AIDS Retrovirol**, v.14, n.5, p.408-414, 1997.

LUO, X., BUDIHardJO, I., ZOU, H., et al. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. **Cell**, v.94, n.4, p.481-490, 1998.

LUSTER, A.D. Chemokines-chemotactic molecules that mediate inflammation. **N. Engl. J. Med.**, n.338, p. 436-445, 1998.

MACCHIA, D., ALMERIGOGNA, F., PARRONCHI, P., et al. Membrane tumour necrosis factor-alpha is involved in the polyclonal B-cell activation induced by HIV-infected human T cells. **Nature**, London, v.363, n.6428, p.464-466, 1993.

MAHIEUX, R., LAMBERT, P.F., AGBOTTAH, E., et al. Cell cycle regulation of human interleukin-8 gene expression by the human immunodeficiency virus type 1 Tat protein. **J. Virol.**, Washington, v.75, n.4, p.1736-1743, 2001.

MAY, J.M. Ascorbate function and metabolism in the human erythrocyte. **Front. Biosci.**, n. 3, d1-d10, 1998a.

MEISTER, A. Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n.13, p.9397-9400, 1994b.

MEISTER, A. Glutathione, ascorbate, and cellular protection. **Cancer Res.**, v. 54, p. 1969S-1975S, 1994a.

MENDIRATTA, S., QU, Z.C., MAY, J.M. Erythrocyte ascorbate recycling: Antioxidant effects in blood. **Free Radic. Biol. Med.**, in press, 1998.

MEYAARD, L., OTTO, S.A., SCHUITMAKER, H., et al. Effects of HIV-1 Tat protein on human T cell proliferation. **Eur. J. Immunol.**, v.22, n.10, p. 2729-2732, 1992.

MEYDANI, S.N., BEHARKA, A.A. Recent developments in vitamin E and the immune response. **Nutr. Rev.**, v.56, Suppl. II, p. S49-S58, 1996.

MOLECULAR PROBES INC. Live/Dead Viability/Cytotoxicity kit (L-3224). Eugene, 1999. 6p. Manual Técnico.

MILLER, A., GRIFFIN G.E., BATMAN P, et al. Jejunal mucosal architecture and fat absorption in male homosexuals infected with human immunodeficiency virus. **Q. J. Med.**, v. 69, p. 1009-1019, 1988.

MOIR, S., MALASPINA, A., OGWARO, K.M., et al. HIV-1 induces phenotypic and functional perturbations on B cells in chronically infected individuals. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v.98, n.18, p.10362-10367, 2001.

MONTELLA, F., PEZZOTTI, P., DI SORA, F., et al. Improving the prognostic value of CD4+ count using IgA and clinical signs in HIV-seropositive i.v. drug users. **Infection**, v. 25, n.2, p.117-120,1997.

MÜLLER, F., SVARDAL, A.M., NORDOYL, I., et al. Virological and immunological effects of antioxidant treatment in patients with HIV infection. **Eur. J. Clin. Invest.**, Berlin, v.30, n.10, p.905-914, 2000.

MÜLLER, F., AUKRUST, P., FROLAND, S.S. Possible role of interleukin-10 (IL-10) and CD40 ligand expression in the pathogenesis of hypergammaglobulinemia in Human Immunodeficiency Virus infection: modulation of IL-10 and Ig production after intravenous Ig infusion. **Blood.**, v.92, n.10, p. 3721-3729, 1998.

MURDOCH, C., FINN, A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infections disease. **Blood**, v.95, p.3032-3043, 2000.

NAGASE, H., AGEMATSU, K., KITANO, K., et al. Mechanism of hypergammaglobulinemia by HIV infection: circulating memory B-cell reduction with plasmacytosis. **Clin. Immunol.**, v.100, n.2, p. 250-259, 2001.

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

NIKI, E., NOGUCHI, N., TSUCHIHASHI, H., et al. Interaction among vitamin C, vitamin E, and beta-carote. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.62, Suppl. 6, p. 1322S-1326S, 1995.

NIKI, E., YAMAMOTO, Y., TAKAHASHI, M., et al. Free-radical mediated damage of blood and its inhibition by antioxidants. **J. Nutr. Sci. Vitam.**, v.34, p. 507-512, 1988.

NOTERMANS, D.W., DE JONG, J.J., GOUDSMIT, J., et al. Potent antiretroviral therapy initiates normalization of hypergammaglobulinemia and a decline in HIV type 1-specific antibody responses. **AIDS Res. Hum. Retrov.**, New York, v.17, n.11, p.1003-1008, 2001.

OGG, G.S., JIN, X., BONHOEFFER, S., et al. Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA. **Science**, Washington, v.279, n.5359, p.2103-2106, 1998.

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

PAKKER, N.G., NOTERMANS, D.W., DE BOER, R.J., et al. Biophasic kinetics of peripheral blood T cells after triple combination therapy in HIV-1 infection: a composite of redistribution and proliferation. **Nat. Med.**, v.4, n.2, p. 208-214, 1998.

PANTALEO, G., FAUCI, A.S. Apoptosis in HIV infection. **Nat. Med.**, v.1, n.2, p.118-120, 1995.

PANTALEO, G., GRAZIOSI, C., FAUCI, A.S. The role of lymphoid organs in the immunopathogenesis of HIV infection. **AIDS**, London, v.7, Suppl.1, p. 19-23, 1993.

PASCALE, J.M., ISAACS, M.D., CONTRERAS, P., et al. Immunological markers of disease progression in patients infected with the human immunodeficiency virus. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, Washington, v.4, n.4, p.474-477, 1997.

PEACE, G.W., LEAF, C.D. The rise of oxidative stress in HIV disease. **Free Radic. Biol. Med.**, v.19, p. 523-528, 1995.

PIETTE, J., LEGRAND-POELS, S. HIV-1 reactivation after an oxidative stress mediated by different reactive oxygen species. **Chem. Biol. Interact.**, v.91, n.2-3, p.79-89, 1994.

POLI, G. Chemokines and the human immunodeficiency virus. **Chem. Immunol.**, v.72, p.121-140, 1999.

POLI, G., PANTALEO, G., FAUCI, A.S. Immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. **Clin. Infect. Dis.**, v.17, suppl.1, p.224-229, 1993.

QUINN, T.C. Acute primary HIV infection. **JAMA**, v.278, p.58-62, 1997.

QUINN, T.C. Global burden of the AIDS pandemic. **Lancet**, v. 348, p.99-106, 1996.

RADRIZZANI, M., ACCORNERO, P., DELIA, D., et al. Apoptosis induced by HIV-gp120 in a Th1 clone involves the generation of reactive oxygen intermediates downstream CD95 triggering. **FEBS Lett.**, v.411. p.87-92, 1997.

RASOLA, A., GRAMAGLIA, D., BOCCACCIO, C., COMOGLIO, P.M. Apoptosis enhancement by the HIV-1 Nef protein. **J. Immunol.**, Baltimore, v.166, n.1, p.81-88, 2001.

RIBOLDI, P., GAIDANO, G., SCHETTINO, E.W., et al. Two acquired immunodeficiency syndrome-associated Burkitt's lymphomas produce specific anti-i IgM cold agglutinins using somatically mutated VH 4-21 segments. **Blood**, v.83, p. 2952-2961, 1994.

ROBERTSON, D.L., ANDERSON, J.P., BRADAC, J.A., et al. HIV-1 nomenclature proposal. **Science**, v.288, n. 5463, p.55-56, 2000.

ROGER, P.M., BREITTMAYER, J.P., ARLOTTO, C., et al. Highly active anti-retroviral therapy (HAART) is associated with a lower level of CD4+ T cell apoptosis in HIV-infected patients. **Clin. Exp. Immunol.**, London, v.118, n.3, p.412-416, 1999.

ROSE, R.C. Transport of ascorbic acid and other water-soluble vitamins. **Biochim. Biophys. Acta**, v.947, p.335-366, 1988.

ROSENBERG, E., BILLINGSLEY, J., CALIENDO, A., et al. Vigorous HIV-1-specific CD4+T cell responses associated with control of viremia. **Science**, n.278, p.1447-1450, 1997.

ROSENBERG, Z.F., FAUCI, A.S. Immunopathogenesis of HIV infection. **FASEB**, v.5, n.10, p.2382-2390. 1991.

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

ROUX, P., ALFIERI, C., HRIMECH, M., et al. Activation of transcription factors NF-kappaB and NF-IL-6 by human immunodeficiency virus type 1 protein R (Vpr) induces interleukin-8 expression. **J. Virol.**, Washington, v.74, n.10, p.4658-4665, 2000.

RUIZ, M.E., CICALA, C., ARTHOS, J.P. Peripheral blood-derived CD34+ progenitor cells: CXC chemokines receptor 4 and CC chemokines receptor 5 expression and infection by HIV. **J. Immunol.**, n.61, p.4169-4176, 1998.

SABIN, C.A., DEVEREUX, H., PHILLIPS, A.N., et al. Immune markers and viral load after HIV-1 seroconversion as predictors of disease progression in a cohort of haemophilic men. **AIDS**, London, v.12, n.11, p.1347-1352, 1998.

SAIKUMAR, P., DONG, Z., MIKAILOW, V., et al. Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. **Am. J. Med.**, v.107, n.5, p.489-506, 1999.

SCAFFIDI, C., FULDA, S., SRINIVASAN, A., et al. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. **EMBO J.**, v.17, n.6, p.1675-1687, 1998.

SCHRECK, R., RIEBER, P., BAEUERLE, P.A. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. **EMBO J.**, v.10, n.8, p.2247-2258, 1991.

SCHWARTLANDER, B., BEK, B., SKARABIS, H., et al. Improvement of the predictive value of CD4+ lymphocyte count by beta 2-microglobulin,

immunoglobulin A and erythrocyte sedimentation rate. The Multicentre Cohort Study Group. **AIDS**, London, v.7, n.6, p.813-821, 1993.

SHI, M., TAYLOR, J.M., FAHEY, J.L., et al. Early levels of CD4, neopterin, and beta 2-microglobulin indicate future disease progression. **J. Clin. Immunol.**, New York, v.17, n.1, p.43-52, 1997.

SHOR-POSNER, G., LECUSAY, R., MORALES, G., et al. Neuroprotection in HIV-positive drug users: Implications for antioxidant therapy. **J. AIDS**, v.31, p.S84-S88, 2002.

SOMASUNDARAN, M., ROBINSON, H.L. Unexpectedly high levels of HIV-1 RNA and protein synthesis in a cytotoxic infection. **Science**, n.242, p.1554-1556, 1988.

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

STAAL, F.J.T., ROEDERER, M., HERZENBERG, L.A., et al. Intracellular thiols regulate activation of nuclear factor Kappa B and transcription of human immunodeficiency virus. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 87, p.9943-9947, 1990.

STINE, G.J. **AIDS Update: An Annual Overview of Acquired Immune Deficiency Syndrome**. Englewood Cliffs, N. J.: Prentice Hall, p.p.486, 2000.

SUZUKI, Y.J., PACKER, L. Inhibition of NF- κ B activation by vitamin E derivatives. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.193, p.277-283, 1993.

SZABO, S.J., DIGHE, A.S., GUBLER, U., MURPHY, K.M. Regulation of the interleukin (IL)-12R2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th 2 cells. **J. Exp. Med.**, n.185, p.817-824, 1997.

TANOWITZ, H. B., SIMON, D., WEISS, L. M., et al. Gastrointestinal manifestations. In: Management of the HIV-infected patient, part I. **Med. Clin. N. Amer.**, v. 80, p.1395-1414, 1996.

TEIXEIRA, L., VALDEZ, H., MCCUNE, J.M., et al. Poor CD4 T cell restoration after suppression of HIV-1 replication may reflect lower thymic function. **AIDS**, v.15, n.14, p. 1749-1756, 2001.

THIRY, L., SPRECHER-GOLDBERGER, S., JONCKHEER, T., et al. Isolation of AIDS virus from cell-free breast milk of three healthy virus carriers. **Lancet**, v.2, n.8460, p.891-892, 1985.

THOMPSON, J.E., PHILLIPS, R.J., ERDJUMENT-BROMAGE, H., et al. I- κ B regulates the persistent responses in a biphasic activation on NF- κ B. **Cell**, v.80, p.573-582, 1995.

TREITINGER, A., SPADA, C., VERDI, J.C., et al. Decreased antioxidant defence in individuals infected by the human immunodeficiency virus. **Eur. J. Clin. Invest.**, v.30, p.454-459, 2000.

ULLUM, H., LEPRI, A.C., KATZENSTEIN, T.L., et al. Prognostic value of single measurements of beta-2-microglobulin, immunoglobulin A in HIV disease after controlling for CD4 lymphocyte counts and plasma HIV RNA levels. **Scand. J. Infect. Dis.**, Stockholm, v.32, n.4, p.371-376, 2000.

UNAIDS/WHO. AIDS epidemic update: Junho 2004. <http://www.unaids.org>. Acessado em novembro de 2004.

UNAIDS. Workshop report from the European commission and the Joint United programme on HIV/AIDS 1997. **AIDS**, 11: UNAIDS 17- 36, 1997.

VAUX, D.L., STRASSER, A. The molecular biology of apoptosis. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.93, p.2239-2244, 1996.

VERONESI, R., FOCACCIA, R., LOMAR, A.V. **Retrovíroses humanas - HIV/AIDS: etiologia, patogénia, patología clínica, tratamento e prevenção**. São Paulo: Editora Atheneu, 2000. 436p.

VLAHAKIS, S.R., ALGECIRAS-SCHIMNICH, A., BOU, G., et al. Chemokine-receptor activation by env determines the mechanism of death in HIV-infected and uninfected T lymphocytes. **J. Clin. Invest.**, Berlin, v.107, n.2, p.207-215, 2001.

WANG, Y., RUSSO, T.A., KWON, O., et al. Ascorbate recycling in human neutrophils: induction by bacteria. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v.94, n.25, p.13816-13819, 1997.

WANG, Y., WATSON, R.R. Potencial therapeutics of vitamin E (tocopherol) in AIDS and HIV. **Drugs**, n.48, n.327-338, 1994.

WHITE, D.O., FENNER, F.J. **Retroviridae**. In: Medical Virology, p. 538-560. Academic Press, 1994.

WIGG, M.D., ROMANOS, M.T.V. **Introdução à Virologia Humana**. Rio de Janeiro (RJ), editora Guanabara Koogan, 254p, 2002.

WILEY, S.R., SCHOOLEY, K., SMOLAK, P.J., et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. **Immunol.**, n.3, p.673-682, 1995.

WOFSY, C.B., COHEN, J.B., HAUER, L.B., et al. Isolation of AIDS-associated retrovirus from genital secretions of women with antibodies to the virus. **Lancet**, v.1, n.8480, p.527-529, 1986.

WONG, G.H.W., MCHUGH, T., WEBER, R., GOEDDEL, D.V. Tumor necrosis factor alpha selectively sensitizes human immunodeficiency virus infected cells to heat and radiation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.88, p.4372-4376, 1991.

XU, D., CHAN, W.L., LEUNG, B.P., et al. Selective expression and functions of interleukin 18 receptor on T helper (Th) type 1 but not Th-2 cells. **J. Exp. Med.**, n.188, p.1485-1492, 1998.

YOUNG, B., KURITZKES, D.R. Viral kinetics: implications for treatment. **AIDS**, v.13, suppl.1, p.S11-S17, 1999.

ZAITSEVA, M., LEE, S., LAPHAM, C., et al. Interferon gamma and interleukin 6 modulate the susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection. **Blood**, v.96, n.9, p.3109-3117, 2000.

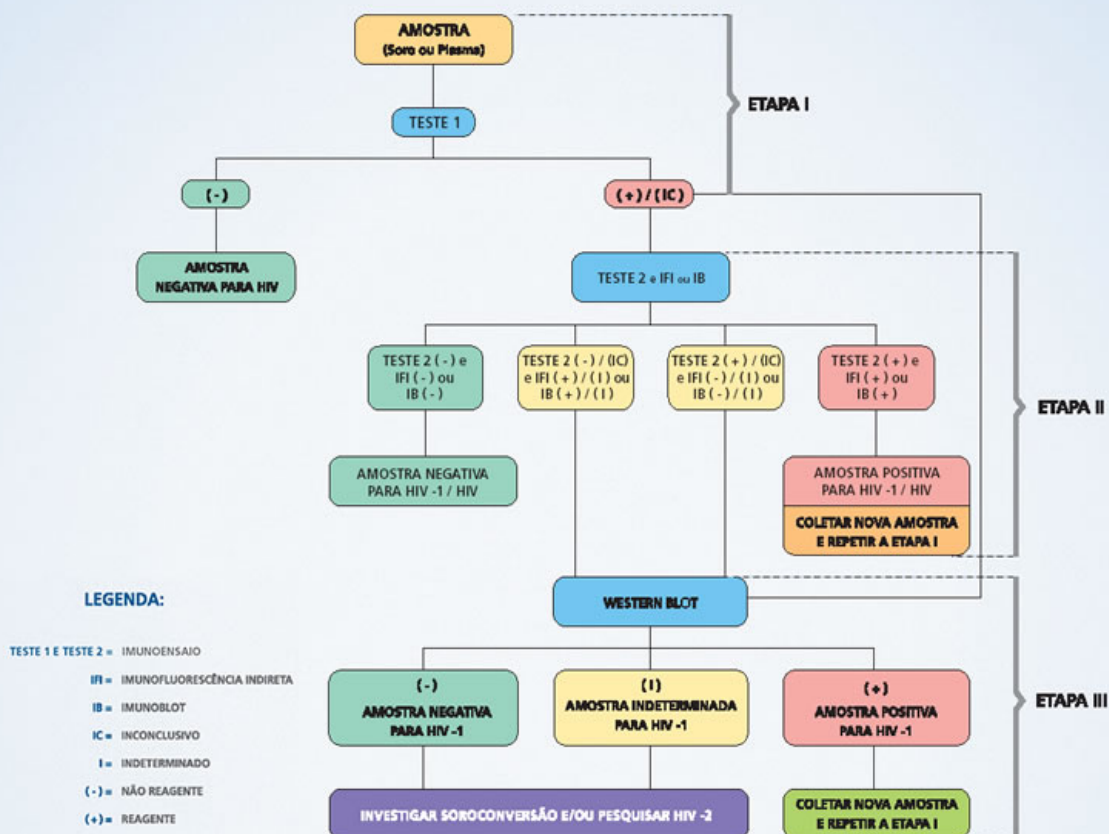
ZIEGLER, J.B., COOPER, D.A., JOHNSON, R.O., GOLD, J. Postnatal transmission of AIDS-associated retrovirus from mother to infant. **Lancet**, v.1, n.8434, p.896-898, 1985.

ANEXOS

ANEXO 1

Fluxograma para diagnóstico da infecção pelo HIV em indivíduos maiores de dois anos de idade, estabelecido pelo Ministério da Saúde em 2003.

FLUXOGRAMA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-HIV EM INDIVÍDUOS COM IDADE ACIMA DE 2 ANOS



DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA INFECÇÃO PELO HIV EM INDIVÍDUOS COM IDADE ACIMA DE 2 ANOS

A realização do diagnóstico laboratorial da infecção pelo HIV nos laboratórios públicos e privados é regulamentada pela Portaria de nº 59/GM/MS, de 28 de janeiro de 2003 que determina um conjunto de procedimentos em seqüência denominado "Fluxograma para detecção de anticorpos anti-HIV em indivíduos com idade acima de 2 anos." Após a realização deste fluxograma de testes, podemos encontrar os resultados descritos a seguir:

AMOSTRA NEGATIVA PARA HIV

Não há necessidade de coletar nova amostra, salvo nos casos onde há indicação de investigação de soroconversão e/ou pesquisa de HIV -2.

AMOSTRA POSITIVA PARA HIV/HIV -1

É obrigatória a coleta de uma segunda amostra para confirmar a positividade da primeira amostra, preferencialmente em um intervalo de até 30 dias após a emissão do resultado referente à primeira amostra. Sempre que os resultados da segunda amostra forem diferentes dos obtidos com a primeira amostra, será preciso considerar a possibilidade de ter havido troca de amostras ou algum erro inerente aos procedimentos de realização dos testes.

AMOSTRA INDETERMINADA PARA HIV -1

Recomenda-se fazer a coleta de uma segunda amostra 30 dias após a emissão do resultado da primeira amostra para investigação de soroconversão. A investigação do HIV -2 é recomendada somente quando os dados epidemiológicos forem sugestivos de infecção por esse vírus ou se os dados clínicos forem compatíveis com a infecção HIV/aids.



Informações adicionais podem ser obtidas no endereço:
www.aids.gov.br/diagnostico/documentos/notas_do_fluxograma e no Manual de Recomendações para Profilaxia da Transmissão Vertical do HIV e Terapia Anti-Retroviral em Gestantes - Ministério da Saúde, 2003.



(Fonte: www.aids.gov.br. Acessado em 17 de Dezembro de 2004)

ANEXO 2

Tabelas de resultados estatísticos dos marcadores avaliados

Tabela 2: Níveis basais de linfócitos CD4+/mm³, e após 60, 120 e 180 dias de iniciados os tratamentos, nos pacientes do grupo Controle, Ascorbato e NAC.

Grupo Controle (n=15)				
Tempo (dias)	Média*	Desvio Padrão	Valor Máximo	Valor Mínimo
0	310 ^a	164	639	45
60	410 ^b	239	793	57
120	430 ^b	218	808	96
180	465 ^b	146	885	125
Grupo Ascorbato (n=13)				
Tempo (dias)	Média*	Desvio Padrão	Valor Máximo	Valor Mínimo
0	200 ^a	106	382	23
60	331 ^b	196	855	65
120	306 ^b	120	540	157
180	312 ^b	166	621	81
Grupo N-Acetil-Cisteína (n=10)				
Tempo (dias)	Média*	Desvio Padrão	Valor Máximo	Valor Mínimo
0	237 ^a	98	393	125
60	310 ^b	108	453	166
120	309 ^b	71	415	213
180	321 ^b	114	471	158

Análise de variância para as hipóteses H_0 :

Não existe diferença entre os tempos: $p < 0,05$

Não existe diferença entre os tratamentos ao longo do tempo: $p > 0,05$

*Comparações múltiplas entre os tempos em cada tratamento avaliado através dos contrastes de repetição, diferença e Helmert. Letras diferentes indicam diferenças significativas: $p < 0,05$

n= Número de pacientes estudados

Tabela 3: Níveis basais de linfócitos CD8+/mm³, e após 60, 120 e 180 dias de iniciados os tratamentos, nos pacientes do grupo Controle, Ascorbato e NAC.

Grupo Controle (n=15)				
Tempo (dias)	Média*	Desvio Padrão	Valor Máximo	Valor Mínimo
0	911	491	1688	380
60	818	379	1614	340
120	828	289	1316	300
180	830	204	1414	487
Grupo Ascorbato (n=13)				
Tempo (dias)	Média*	Desvio Padrão	Valor Máximo	Valor Mínimo
0	1075	769	2938	216
60	1154	637	2453	417
120	1020	613	2168	403
180	1001	614	2428	342
Grupo N-Acetil-Cisteína (n=10)				
Tempo (dias)	Média*	Desvio Padrão	Valor Máximo	Valor Mínimo
0	905	512	1999	579
60	985	554	1990	538
120	913	457	1683	357
180	886	605	1986	445

Análise de variância para as hipóteses H_0 :

Não existe diferença entre os tempos: $p < 0,05$

Não existe diferença entre os tratamentos ao longo do tempo: $p > 0,05$

*Comparações múltiplas entre os tempos em cada tratamento avaliado através dos contrastes de repetição, diferença e Helmert. Letras diferentes indicam diferenças significativas: $p < 0,05$

n= Número de pacientes estudados

Tabela 4: Níveis basais de linfócitos CD4/CD8, e após 60, 120 e 180 dias de iniciados os tratamentos, nos pacientes do grupo Controle, Ascorbato e NAC.

Grupo Controle (n=15)				
Tempo (dias)	Média*	Desvio Padrão	Valor Máximo	Valor Mínimo
0	0,37 ^a	0,20	0,87	0,10
60	0,54 ^b	0,29	1,23	0,09
120	0,54 ^b	0,23	0,89	0,14
180	0,56 ^b	0,26	0,98	0,13
Grupo Ascorbato (n=13)				
Tempo (dias)	Média*	Desvio Padrão	Valor Máximo	Valor Mínimo
0	0,25 ^a	0,20	0,74	0,01
60	0,37 ^b	0,27	0,85	0,02
120	0,44 ^c	0,29	0,95	0,05
180	0,43 ^c	0,30	0,87	0,03
Grupo N-Acetil-Cisteína (n=10)				
Tempo (dias)	Média*	Desvio Padrão	Valor Máximo	Valor Mínimo
0	0,23 ^a	0,12	0,38	0,07
60	0,31 ^b	0,22	0,72	0,09
120	0,37 ^c	0,20	0,67	0,17
180	0,37 ^c	0,23	0,73	0,14

Análise de variância para as hipóteses H_0 :

Não existe diferença entre os tempos: $p < 0,05$

Não existe diferença entre os tratamentos ao longo do tempo: $p > 0,05$

*Comparações múltiplas entre os tempos em cada tratamento avaliado através dos contrastes de repetição, diferença e Helmert. Letras diferentes indicam diferenças significativas: $p < 0,05$

n= Número de pacientes estudados

Tabela 5: Níveis basais de linfócitos vivos em percentual (%), e após 60, 120 e 180 dias de iniciados os tratamentos, nos pacientes do grupo Controle, Ascorbato e NAC.

Grupo Controle (n=15)				
Tempo (dias)	Média*	Desvio Padrão	Valor Máximo	Valor Mínimo
0	22,63 ^a	18,45	55,55	2,51
60	31,79 ^b	15,24	56,28	11,15
120	35,38 ^c	17,25	58,70	10,78
180	44,17 ^d	18,96	73,22	15,16
Grupo Ascorbato (n=13)				
Tempo (dias)	Média*	Desvio Padrão	Valor Máximo	Valor Mínimo
0	47,85 ^a	22,48	78,66	5,08
60	66,68 ^b	18,34	86,84	33,45
120	77,95 ^c	15,18	93,19	40,10
180	80,62 ^c	18,24	91,03	24,68
Grupo N-Acetil-Cisteína (n=10)				
Tempo (dias)	Média*	Desvio Padrão	Valor Máximo	Valor Mínimo
0	27,63 ^a	18,69	49,81	1,96
60	22,41 ^a	19,15	61,16	2,39
120	28,21 ^b	18,06	57,05	24,36
180	29,13 ^b	18,07	60,00	4,40

Análise de variância para as hipóteses H_0 :

Não existe diferença entre os tempos: $p < 0,05$

Não existe diferença entre os tratamentos ao longo do tempo: $p < 0,05$

*Comparações múltiplas entre os tempos em cada tratamento avaliado através dos contrastes de repetição, diferença e Helmert. Letras diferentes indicam diferenças significativas: $p < 0,05$

n= Número de pacientes estudados

Tabela 6: Níveis basais de linfócitos em apoptose, em percentual (%), e após 60, 120 e 180 dias de iniciados os tratamentos, nos pacientes do grupo Controle, Ascorbato e NAC.

Grupo Controle (n=15)				
Tempo (dias)	Média*	Desvio Padrão	Valor Máximo	Valor Mínimo
0	65,89 ^a	16,89	88,14	38,22
60	59,92 ^b	16,96	85,44	38,14
120	50,61 ^c	17,46	80,91	21,35
180	48,92 ^c	17,40	82,95	22,03
Grupo Ascorbato (n=13)				
Tempo (dias)	Média*	Desvio Padrão	Valor Máximo	Valor Mínimo
0	48,81 ^a	20,49	88,22	17,87
60	30,40 ^b	16,31	62,68	12,61
120	17,21 ^c	9,26	40,06	6,29
180	18,49 ^c	17,99	73,82	8,21
Grupo N-Acetil-Cisteína (n=10)				
Tempo (dias)	Média*	Desvio Padrão	Valor Máximo	Valor Mínimo
0	59,54 ^a	21,43	93,00	15,59
60	59,74 ^a	26,71	93,82	13,65
120	62,77 ^b	18,98	89,37	32,53
180	58,87 ^b	16,98	86,79	35,38

Análise de variância para as hipóteses H_0 :

Não existe diferença entre os tempos: $p < 0,05$

Não existe diferença entre os tratamentos ao longo do tempo: $p < 0,05$

*Comparações múltiplas entre os tempos em cada tratamento avaliado através dos contrastes de repetição, diferença e Helmert. Letras diferentes indicam diferenças significativas: $p < 0,05$

n= Número de pacientes estudados

Tabela 7: Níveis basais de linfócitos mortos, em percentual (%), e após 60, 120 e 180 dias de iniciados os tratamentos, nos pacientes do grupo Controle, Ascorbato e NAC.

Grupo Controle (n=15)				
Tempo (dias)	Média*	Desvio Padrão	Valor Máximo	Valor Mínimo
0	11,29 ^a	7,90	25,81	1,36
60	7,95 ^b	6,19	21,06	0,42
120	9,88 ^a	7,38	24,80	1,32
180	6,42 ^b	4,82	14,70	1,99
Grupo Ascorbato (n=13)				
Tempo (dias)	Média*	Desvio Padrão	Valor Máximo	Valor Mínimo
0	4,69 ^a	2,12	9,66	1,12
60	2,87 ^a	2,84	10,46	0,18
120	2,35 ^b	2,76	10,46	0,35
180	1,00 ^b	0,56	2,44	0,31
Grupo N-Acetil-Cisteína (n=10)				
Tempo (dias)	Média*	Desvio Padrão	Valor Máximo	Valor Mínimo
0	10,42 ^a	7,99	34,60	1,17
60	10,68 ^a	6,39	91,54	2,89
120	7,39 ^b	2,01	9,51	4,35
180	7,04 ^b	4,81	90,37	3,35

Análise de variância para as hipóteses H_0 :

Não existe diferença entre os tempos: $p < 0,05$

Não existe diferença entre os tratamentos ao longo do tempo: $p > 0,05$

*Comparações múltiplas entre os tempos em cada tratamento avaliado através dos contrastes de repetição, diferença e Helmert. Letras diferentes indicam diferenças significativas: $p < 0,05$

n= Número de pacientes estudados

Tabela 8: Níveis basais de globulinas (g/dL), e após 60, 120 e 180 dias de iniciados os tratamentos, nos pacientes do grupo Controle, Ascorbato e NAC.

Grupo Controle (n=15)				
Tempo (dias)	Média*	Desvio Padrão	Valor Máximo	Valor Mínimo
0	4,36 ^a	0,55	5,30	3,40
60	3,89 ^b	0,67	5,20	2,80
120	3,71 ^b	0,50	4,60	3,00
180	3,46 ^c	0,57	4,50	2,90
Grupo Ascorbato (n=13)				
Tempo (dias)	Média*	Desvio Padrão	Valor Máximo	Valor Mínimo
0	4,26 ^a	0,75	6,00	3,60
60	3,93 ^b	0,83	5,40	3,00
120	3,86 ^b	0,84	5,90	2,90
180	3,97 ^b	0,67	5,30	3,00
Grupo N-Acetil-Cisteína (n=10)				
Tempo (dias)	Média*	Desvio Padrão	Valor Máximo	Valor Mínimo
0	4,22 ^a	0,71	5,70	3,30
60	4,03 ^b	0,90	6,40	3,10
120	3,94 ^b	0,88	5,50	2,50
180	3,92 ^b	0,91	5,90	3,00

Análise de variância para as hipóteses H_0 :

Não existe diferença entre os tempos: $p < 0,05$

Não existe diferença entre os tratamentos ao longo do tempo: $p > 0,05$

*Comparações múltiplas entre os tempos em cada tratamento avaliado através dos contrastes de repetição, diferença e Helmert. Letras diferentes indicam diferenças significativas: $p < 0,05$

n= Número de pacientes estudados

Tabela 9: Níveis séricos basais de IgA (mg/dL), e após 60, 120 e 180 dias de iniciados os tratamentos, nos pacientes do grupo Controle, Ascorbato e NAC.

Grupo Controle (n=15)				
Tempo (dias)	Média*	Desvio Padrão	Valor Máximo	Valor Mínimo
0	369,56 ^a	281,46	877	119
60	306,93 ^b	210,72	730	103
120	281,12 ^b	195,60	510	93
180	334,07 ^b	217,88	438	134
Grupo Ascorbato (n=13)				
Tempo (dias)	Média*	Desvio Padrão	Valor Máximo	Valor Mínimo
0	356,59 ^a	180,43	812	107
60	385,63 ^a	289,44	1123	86
120	301,30 ^b	167,01	704	80
180	314,86 ^b	228,05	967	61
Grupo N-Acetil-Cisteína (n=10)				
Tempo (dias)	Média*	Desvio Padrão	Valor Máximo	Valor Mínimo
0	404,00 ^a	152,24	692	183
60	378,00 ^b	157,14	611	171
120	331,77 ^b	123,32	539	149
180	360,90 ^b	179,80	572	69

Análise de variância para as hipóteses H_0 :

Não existe diferença entre os tempos: $p < 0,05$

Não existe diferença entre os tratamentos ao longo do tempo: $p > 0,05$

*Comparações múltiplas entre os tempos em cada tratamento avaliado através dos contrastes de repetição, diferença e Helmert. Letras diferentes indicam diferenças significativas: $p < 0,05$

n= Número de pacientes estudados

Tabela 10: Níveis séricos basais de IgG (mg/dL), e após 60, 120 e 180 dias de iniciados os tratamentos, nos pacientes do grupo Controle, Ascorbato e NAC.

Grupo Controle (n=15)				
Tempo (dias)	Média*	Desvio Padrão	Valor Máximo	Valor Mínimo
0	2272,5 ^a	690,60	3450	1070
60	1691,30 ^b	443,96	2490	981
120	1741,10 ^b	512,90	2640	748
180	1655,50 ^b	509,05	2810	767
Grupo Ascorbato (n=13)				
Tempo (dias)	Média*	Desvio Padrão	Valor Máximo	Valor Mínimo
0	2306,70 ^a	771,34	4116	1480
60	1988,50 ^b	701,62	4040	1130
120	1843,00 ^b	613,30	3252	1100
180	1685,00 ^c	548,49	2803	1390
Grupo N-Acetil-Cisteína (n=10)				
Tempo (dias)	Média*	Desvio Padrão	Valor Máximo	Valor Mínimo
0	2157,00 ^a	714,12	3820	1400
60	2078,00 ^b	689,92	3550	1320
120	1917,70 ^b	718,88	3460	1060
180	2023,00 ^b	879,00	3560	950

Análise de variância para as hipóteses H_0 :

Não existe diferença entre os tempos: $p < 0,05$

Não existe diferença entre os tratamentos ao longo do tempo: $p > 0,05$

*Comparações múltiplas entre os tempos em cada tratamento avaliado através dos contrastes de repetição, diferença e Helmert. Letras diferentes indicam diferenças significativas: $p < 0,05$

n= Número de pacientes estudados

Tabela 11: Níveis séricos basais de IgM (mg/dL), e após 60, 120 e 180 dias de iniciados os tratamentos, nos pacientes do grupo Controle, Ascorbato e NAC.

Grupo Controle (n=15)				
Tempo (dias)	Média*	Desvio Padrão	Valor Máximo	Valor Mínimo
0	178,76 ^a	75,71	298	65
60	119,26 ^b	52,43	254	43
120	109,26 ^b	62,39	228	39
180	129,34 ^b	78,04	350	52
Grupo Ascorbato (n=13)				
Tempo (dias)	Média*	Desvio Padrão	Valor Máximo	Valor Mínimo
0	177,59 ^a	85,01	366	88
60	120,74 ^b	42,27	205	36
120	110,52 ^b	55,81	245	52
180	92,30 ^c	36,49	128	58
Grupo N-Acetil-Cisteína (n=10)				
Tempo (dias)	Média*	Desvio Padrão	Valor Máximo	Valor Mínimo
0	227,89 ^a	124,32	418	64
60	172,41 ^b	96,40	276	53
120	133,90 ^c	50,33	196	53
180	188,77 ^b	81,30	354	124

Análise de variância para as hipóteses H_0 :

Não existe diferença entre os tempos: $p < 0,05$

Não existe diferença entre os tratamentos ao longo do tempo: $p > 0,05$

*Comparações múltiplas entre os tempos em cada tratamento avaliado através dos contrastes de repetição, diferença e Helmert. Letras diferentes indicam diferenças significativas: $p < 0,05$

n= Número de pacientes estudados

Tabela 12: Níveis séricos basais de β -2 Microglobulina, e após 60, 120 e 180 dias de iniciados os tratamentos, nos pacientes do grupo Controle, Ascorbato e NAC.

Grupo Controle (n=15)				
Tempo (dias)	Média*	Desvio Padrão	Valor Máximo	Valor Mínimo
0	2872,26 ^a	543,06	4028	1911
60	2395,31 ^b	449,27	3070	1341
120	2305,93 ^b	458,57	2623	1308
180	2232,31 ^b	558,60	3018	1431
Grupo Ascorbato (n=13)				
Tempo (dias)	Média*	Desvio Padrão	Valor Máximo	Valor Mínimo
0	2715,61 ^a	902,55	4406	1597
60	1856,00 ^b	346,08	2277	1004
120	1729,66 ^b	482,85	2917	1144
180	1661,18 ^c	559,03	2516	1056
Grupo N-Acetil-Cisteína (n=10)				
Tempo (dias)	Média*	Desvio Padrão	Valor Máximo	Valor Mínimo
0	3197,90 ^a	858,00	5248	2341
60	2845,00 ^b	718,53	4100	1894
120	2666,00 ^b	750,57	3846	1976
180	2458,20 ^c	716,85	4223	1927

Análise de variância para as hipóteses H_0 :

Não existe diferença entre os tempos: $p < 0,05$

Não existe diferença entre os tratamentos ao longo do tempo: $p > 0,05$

*Comparações múltiplas entre os tempos em cada tratamento avaliado através dos contrastes de repetição, diferença e Helmert. Letras diferentes indicam diferenças significativas: $p < 0,05$

n= Número de pacientes estudados

ANEXO 3

**Quadros com os resultados dos marcadores avaliados em cada
paciente nos grupos estudo e controle**

ANEXO 4

**Parecer do Comitê em Pesquisa com Seres Humanos da
Universidade Federal de Santa Catarina**

ANEXO 5

**Termo de Consentimento dos Pacientes HIV+
que participaram do estudo**

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu _____, após ser esclarecido verbalmente sobre a presente pesquisa, aceitei espontaneamente à 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 afim 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 de Análises Clínicas do Hospital Universitário (LAC/HU), sito no Campus da Universidade federal de Santa Catarina, na cidade de Florianópolis. Comprometo-me também de retornar ao ambulatório médico DST/AIDS, do ambulatório do Hospital Universitário 60, 120 e 180 dias após iniciada a medicação, conforme será agendado para acompanhamento clínico e de 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 à respeito do tratamento e dos exames laboratoriais à serem realizados. Estou ciente que, embora estes procedimentos terapêuticos apresentem efeitos colaterais mínimos, terei toda a atenção médica devida, desde que manifeste minha intenção de voltar a ser atendido, além do direito de 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 quaisquer de suas fases. Caso seja de meu interesse, poderei desistir de participar desta pesquisa em qualquer etapa, precisando informar apenas aos médicos e pesquisadores minha intenção neste sentido. Concordo com a publicação dos resultados obtidos na pesquisa e que, caso algum resultado seja de interesse clínico, eu tenha à minha disposição atendimento médico para melhoria da minha saúde. Estou consciente da importância desta pesquisa e de que receberei os resultados com explicação detalhada do seus significados.

Florianópolis, ____/____/____.

Nome Completo: _____

RG: _____ CPF: _____

Rua: _____ Nº: _____

Cidade: _____ CEP: _____

Bairro: _____

Telefone p/ Contato: _____

Assinatura do paciente

