

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA

Karen Ingrid Tasca

**Marcadores de Ativação Imune, Inflamação Crônica e Estresse
Oxidativo em Pessoas que Vivem com o HIV/Aids: a Busca do Melhor
Prognóstico.**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Doutora em Doenças
Tropicais. Área de conhecimento: Imunologia.

Orientadora: Profa. Adjunta Lenice do Rosário de Souza.

Coorientadora: Profa. Mara Biasin.

Botucatu
2016

Karen Ingrid Tasca

**Marcadores de Ativação Imune, Inflamação Crônica e Estresse
Oxidativo em Pessoas que Vivem com o HIV/Aids: a Busca do
Melhor Prognóstico.**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Doutora em Doenças
Tropicais. Área de Conhecimento: Imunologia.

Orientadora: Profa. Adjunta Lenice do Rosário de Souza.

Coorientadora: Profa. Mara Biasin.

Botucatu

2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Tasca, Karen Ingrid.

Marcadores de ativação imune, inflamação crônica e estresse oxidativo em pessoas que vivem com o HIV/Aids : a busca do melhor prognóstico / Karen Ingrid Tasca. - Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Lenice do Rosário de Souza

Coorientador: Mara Biasin

Capes: 21100004

1. AIDS (Doença). 2. HIV (Vírus). 3. Inflamação. 4. Stress oxidativo. 5. Agentes antirretrovirais. 6. Resposta imune.

Palavras-chave: Antirretrovirais; Ativação imune; Estresse oxidativo; HIV/Aids; Inflamação.

*“Que a conversa entre nossos silêncios
não termine logo, tristonhos olhos castanhos,
Rogo de coração que escolhas, dentre as tempestades,
só a que te trouxer calma,
e se por acaso a sorte lhe sorrir... ria!
O apego às vezes é como uma parede
que impede o corpo de receber
um carinho da chuva que cai, e da brisa
fresca que nos beija, pós tempestade...
Aquele que me tem em
verso, prosa e poesia”.*

Andrey S. Santos (em dedicatória)



Dedicatória



À minha família, noivo e amigos...
Aos que me mostram, com o brilho de olhares otimistas,
que tudo está bem - e como deveria...
Aos que me apertam forte com os braços (ou patinhas),
me dando forças pra continuar...
Aos que me presenteiam com boa companhia e café e,
com sorrisos singelos, "saboreiam" a vida comigo...
Aos que ouvem meus anseios de coração aberto,
ou me fazem/fizeram ouvir palavras serenas e lindas canções...
Aos que sentiram comigo, o cheiro de chuva,
daquela comida, da maçãzinha ou da mexerica no pé...
Enfim, a todos aqueles que tocam minha alma e me inspiram...
...Dedico.

(são muitos os sentidos - e sentimentos).

Agradecimentos



Agradecimentos Especiais...

...ao meu companheiro de todos os dias, Renato, por fazer cada dia da minha vida diferente do anterior. Por me tornar, a cada dia, ainda mais esperançosa, grata, sonhadora e feliz! Obrigada por, muitas vezes, me enxergar melhor do que eu realmente sou, por entender que eu choro porque tenho vontade, mas nem sempre tenho motivo... por me esperar e me entender, por me consolar com teus sorrisos e brincadeiras, e despertar o meu melhor! Espero retribuir seu amor, de toda alma e coração.

... à minha mãe Katia, por ter me entendido enquanto eu crescia e por ter aceitado minhas rápidas mudanças e me apoiado em todas as decisões. Por toda calma, amor e cuidado - com nós três! Obrigada por ter me aplaudido quando fui verdadeira, por ter me compreendido quando eu disse mentiras, apesar de me lembrar que elas maculam nosso caráter. Obrigada por ser “você mesma”, não desistir da felicidade e, com isso, me ensinar a importância de se buscar uma vida alegre, sempre.

...ao meu Pai Nelson e amiga Cris, pela atenção, carinho, elogios, incentivos e ótimos conselhos. Obrigada por terem me falado sobre os seus erros e sobre as coisas que aprenderam com eles, isso fez com que eu aceitasse os meus e, também aprendesse e me perdoasse. Tenho muito orgulho e me espelho muito em vocês, que sempre me fizeram sentir confiante, capaz e feliz com minhas escolhas. Espero poder ser digna da fé que vocês depositaram em mim.

...aos meus irmãozinhos Alan e Alex, por me ensinarem que, não importa onde e com quem estamos, o fato simples de “rir”, contagia e dá cor a qualquer ambiente em qualquer tempo, sem preço algum. Quando criança, sentíamos juntos o fervor das brincadeiras, os ressentimentos das broncas, as fantasias próprias da idade... agora, tudo virou lembrança, pra dar lugar a algo novo. Um sentimento lindo e valioso, de cumplicidade no olhar. Que bom que a gente cresceu e, o que antes eram dois dedos apontados pra mim, hoje são mãos que me levantam! Vocês são meus tesouros!

... à madretia Eneide e tia Tânia, pelo zelo, afeto e por, generosamente, me mostrarem que nossa força interior é tudo o que a gente precisa!.. que, se nada mudar, a gente invente e faça acontecer.. e, se algo mudar antes do tempo, que a gente tenha sabedoria e paciência pra entender!.. que, a dificuldade é pra ser enfrentada e, quando tudo ficar fácil, basta juntarmos as mãos e agradecer! Obrigada por serem exemplos de que, palavras são repletas de vibrações, por isso, não devemos perder nenhuma oportunidade de manifestar bons sentimentos e cativar quem nos cerca.

...aos avôs que nos protegem “lá de cima”... Valdemar, Nelson, Linda e Marlene, por serem meus anjos protetores, meus exemplos, meus amores. Entre as lembranças que gosto de ter, os sorrisos de vocês são “a saudade que gosto de lembrar, todos os dias”... Obrigada por estarem presentes, também, nos sons e nas palavras cheias de ternura que ainda carrego, nos cheirinhos e brisas que sinto, no brilho das estrelas.

...às amigas de infância, Bruna, Roberta e Sarah, pela amizade valiosa, uma planta rara que cultivo com muito carinho. Agradeço muito vocês, por permanecerem em minha vida, mesmo eu estando quase sempre tão distante, seja no telhado, nas dancinhas, no terreno baldio, no parque de diversão, nos conselhos, abraços e conversas longas antes de dormir. Obrigada por TUDO!

...às amigas de república, que tive/tenho a sorte gigante em compartilhar momentos inesquecíveis! Obrigada pelas conversas, segredos e aprendizados. Por me darem atenção e gastarem tão grande parte do tempo de vocês comigo; por me dizerem que devemos sorrir às pessoas que não gostam da gente, para mostrá-las que somos muito diferentes do que elas pensam.

... à minha família “mais nova”, sogros, cunhadas e avós: Sergio, Anabela, Anna, Adriana, Seu Antônio e Miluzinha. Obrigada por me acolherem e me abraçarem forte, e pelas palavras gentis que sempre me trazem: forças pra lutar, paz na alma e alegria pelo simples prazer de viver. Quanta sorte tive de encontrar vocês, e trazê-los pra minha vida!

...à minha orientadora e amiga Lenice, por ter me dado claras respostas às perguntas que eu sempre a levava; por ter considerado meus sentimentos e necessidades, me mostrando que, muitas vezes, eles eram muito semelhantes aos seus; por ter me mostrado que ser gentil e atenciosa é mais importante do que estar certa; por ter reforçado minha confiança, para que eu pudesse continuar revelando e defendendo meus pensamentos e princípios. Seus ensinamentos foram muito além dos conteúdos do currículo. Convivemos e tivemos aprendizados importantes para a vida. Muito obrigado pela sua dedicação e paciência durante estes sete anos. À você, toda minha gratidão e meu carinho!

...à Camila, que me auxiliou muito nesta jornada, segurou minha mão e me dirigiu palavras de otimismo. Uma pessoa que tem o dom de acreditar no bem, e em ajudar todos que a procuram, simplesmente por entender nossas dificuldades e acreditar que a força que define o que vai dar certo ou errado na nossa vida, está no nosso interior, em nossa competência, coragem, esforço, fé. Eu não

teria conseguido finalizar esta etapa importante sem você! Obrigada por acreditar em mim, pela profissional competente e determinada e pela pessoinha especial que é!

...aos colaboradores deste trabalho, que moram no meu coração: Juliana, Mari Gatto, Vanessa, Francilene, Mônica e Caio. Agradeço todo esforço e ajuda para que este trabalho ficasse mais bonito, pela amizade que sempre nos ajudou a superar qualquer obstáculo acadêmico ou pessoal, pela confiança, carinho e compreensão sem fim. Por estarem do meu lado, vocês viram de pertinho, como todo este caminho foi percorrido, obrigada pela companhia neste trajeto (não muito fácil, mas compensador) e por me fazerem sentir que sou alguém com quem vocês se importam!

...a Mara Biasin (la "capa del mio cuore"), Fede Gnudi (la mia tata!), Salomè Ibba, Irma Saulle, Mariacristina De Luca, Micaela Garzeano, Sara Yahyaei, Federico Tirabasso, Veronica Rainone, Paolo Cattaneo, Angela Berzi, Daria Trabattoni, e Mario Clerici (Mago). Sono stata molto fortunata ad aver trovato tante persone fantastiche in questo lab, di cui ho fatto parte! E' stato bellissimo conoscervi e aver potuto imparare e lavorare con voi. Siete persone straordinarie, gentili e sempre disponibili. Di parole ne potrei dire tante... ..ma l'unica che racchiude tutto è Grazie di cuore a tutti!

... aos pacientes que aceitaram participar desta pesquisa e muito me ensinaram. Aqueles que não desistem de si mesmos, e que descobriram que a vida é o maior de todos os espetáculos - um espetáculo dado pelo autor da existência. Vou seguir a coragem de vocês, por toda a vida.

Agradecimentos

Meus sinceros agradecimentos...

...a todos que contribuíram com este trabalho de forma direta ou indireta:

*Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina de Botucatu –
FMB/UNESP*

*Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Departamento de Fisiologia*

*Universidade de Milão (Università degli Studi di Milano) – Departamento de Ciências Biomédicas
e Clínicas, Hospedale L. Sacco*

Conselho de Pós-Graduação em Doenças Tropicais

*Seção de Pós-Graduação da FMB, em especial à Janete A. H. N. Silva, Bruna Q. S. Jorgetto, Diego
C. B. Oliveira, Lilian C. N. Bianchi e Solange S. Cagliari*

*Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem e secretários Michele K. L. Nishi,
Júlio C. Botari e André Mioni*

*Serviço de Ambulatórios Especializados de Infectologia “Domingos Alves Meira” (SAEI-DAM), em
especial ao Prof. Dr Alexandre N. Barbosa*

Comissão Permanente de Pesquisa (CPP) da FMB/UNESP

Laboratórios de Citometria e Carga Viral, Divisão de Hemocentro, FMB/UNESP

*Membros da banca de Defesa da Tese: Profa. Dra Silvia Gatti (Universidade de Campinas,
UNICAMP), Prof. Dr Reinaldo Salomão (Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP), Prof.*

*Dr. Igor O. Minatel, Profa. Dra Alexandrina Sartori, Profa. Dra Marjorie A. Golim
(FMB/UNESP), Profa. Dra Karen L. Morejon (Universidade de São Paulo –USP/RP) e Profa.
Dra Daniela Moris (UNOESTE).*

À banca do Exame Geral de Qualificação, Profa. Dra Camila Renata Correa, Prof. Dr João Pessoa de Araújo Júnior, Profa. Dra Alexandrina Sartori (FMB/UNESP) e Dra Susan Pereira Ribeiro (Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, FMUSP), obrigada pela disposição em analisar este trabalho, pela contribuição e valiosas sugestões;

*Meu agradecimento especial aos **Docentes do Departamento de Doenças Tropicais**, Profs Dr Rinaldo P. Mendes, Dr Paulo C.M. Pereira e Prof. Dr Carlos Magno C. B. Fortaleza, pelo apoio, ajuda e incentivo durante estes sete anos que compartilhamos; ao Prof. Dr Ricardo A. M. B Almeida, meu supervisor do Estágio Docência, agradeço muito pela oportunidade, conversas e conselhos; à Profa. Dra Sueli Aparecida Calvi, obrigada por toda assistência, contribuição e estímulo... continue forte como sempre, estamos todos torcendo por você!*

*Agradeço o **Escritório de Apoio à Pesquisa (EAP)**, em especial o prof. Dr. José Eduardo Corrente, responsável pela análise estatística do trabalho; Rita de Cássia Athanázio pelo auxílio na pesquisa, ajuda na captação e administração dos recursos e; as secretárias Cinthia Scolástico C. de Souza e Juliana Interdonato;*

*Meu muito obrigada aos **amigos** (mais amigas) **da MI**, das diversas “gerações”, pela convivência e ajuda no laboratório: Thaty, Drica, Laura, Paty, Thayssa, Andréia, Lariza, Bia, Jéssica, Elaine, Priscila, Lívia, Raquel, Lina, Mizi, Fernanda, Michely, Maria Fernanda, Miriam, Pananã, Daniela, James, Thales e Talísia; aos PIBICs Jr Christian e Karina e ao responsável pelo laboratório, Rodrigo;*

*Aos **colegas do SAEI-DAM** (Hospital Dia), sou muito grata pela assistência e ajuda, tanto no recrutamento dos pacientes e coletas de sangue quanto na disposição da lista de medicamentos: Marli, João Paulo, Sebastião, Vânia, Fabiana, Beatriz, Rodrigo, Jéssica, André, Renata L., Gabriela, Luciene, Rosemeire, Adolfo, Reginaldo, Sandra, Rejane, Solange, Luciana, Lilian, Thaís, Kátia, Zezé, Terezinha, Valéria, Renata M., Priscila, Maiara, Vivian, Maria José, Aline, Cleide, Laena, Tassiana, Leticia, Danilo, Victor, Karina e Waldomiro;*

*Obrigada prof. Dr. Luis Fernando Barbisan e pós graduandos Renata, Bruno e Guilherme do **Laboratório de Carcinogênese Química e Experimental do IBB/Unesp**, pela ajuda e por permitirem a realização da leitura das lâminas do Cometa.*

Aos colegas do Físcel - UFRGS, em especial ao professor Paulo Ivo Bittencourt (PIVO) que sempre esteve muito disposto em me ajudar e me recebeu tão bem no seu laboratório, me presenteou com ótimas conversas, com almoço, cafezinhos, ovos e reagentes! Um exemplo de profissional, que ama o que faz, e de pessoa, que cativa quem tem por perto. Agradeço também as pessoas me ajudaram muito durante os 2 meses de “intensivão de westernblots”: obrigada Cinthia (infinitos “obrigadas” pra você!), Patrícia, Rossana, Maurício, Inês, Grazi, Luiz, Helena, Ritinha, Guilherme, Ítalo, Sofia, Fernanada, Thiago, Aline e Hilton.

Agradeço imensamente todos os funcionários da UNIPLEX-FMB, em especial: Regina, Cilmerly e Silvia que me ajudaram com as técnicas de ELISA e HPLC; Carlinhos, Sueli, Paulinho, Danilinho, Zé Georgete, Marta, Florian, Elisete, Igor, Vicky, Elisete, Rogerio, Mara, Elenize, Vitor e Cristina. Meu obrigada, também, aos pós-graduandos da UNIPLEX Fabiane, Damiana (Patologia) e Vitor (Clínica Médica), sempre muito solícitos. Agradeço imensamente meu amigo Rafael Gelaleti (Ginecologia), pela ajuda no teste do cometa e pelas boas e produtivas conversas, desde a graduação.

Aos amigos de Pós-Graduação, que me acompanharam em vários momentos, de disciplinas às organizações de eventos: Bruna, Gabrielli, Carlos, Mariana, Adriana, Maila e Renata (VI EPG) Gabriel, Nathália, Ingrid, Mariana R, Mariana F, Juliana, Régis, Tatiana, Aline Aki, Natália P, Lígia (VII EPG), Eduardo, Natália, Gustavo Adolfo, Michelle, Vinicius, Marcel, Thaís, Vivian e Tiago (CEVAP) e Daniela (IBB).

Aos funcionários da administração da FMB, sempre muito prestativos: Edson (compras), Karina (internacionalização), Josué (almoxarifado), Renato e Lucas (informática), Ana Paula (CPP), Paulo (central de aulas), Kleber e Beto (CEP).

Aos profissionais que me ajudaram no recrutamento de pacientes de outras cidades, Ártemis de Americana, Marta de Avaré e Giovana e Cibele de Bauru.

Ao Departamento de Biologia e Zootecnia da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – UNESP, pela minha formação, e por sempre me acolherem de braços abertos professores: Wilma (ex-orientadora e supervisora do estágio docência), Marília, Milton, Jorgito, Sérgio, Conceição, Susumu, Edson, Kiko, Chiquitelli, Kuniko, Haga, Rosicleire, Alexandre, Ana Maria e Kitty – e ao funcionário sempre animado, Joarez.

*Agradeço, também, alguns **amigos de Botucatu**, que me fizeram enxergar as coisas de um modo mais tranquilo, sensato e bonito: Lucila (Biopsico), Claudinha (Prana Yoga), Aline (Profa de fotografia - MAC), Helena (Prof de inglês), Tatiana e Luciane (Profas de italiano), Carol Sasso e Vanessa Ito.*

*Grata aos **colegas da UNICAMP**, por sempre torcerem por mim: Profa Silvia Gatti, Maria Clara, Profa Ana Maria Guaraldo (IB) e Laboratório de Pesquisa em Aids: Prof Chico Aoki, Ronald, Elaine, Diogo, Ângela, Daiane, Valéria, Giovana, Michely, Marcina, Vera, Manuel, Paulinho e Gaby;*

*Obrigada, também, **amigos que moram longe** mas são “amigos do peito”: grande amigo físico Cícero, amigos de graduação Aline, Diogenes, Fabinho, Quexada, Flávia, Cecília, Simone, Guará, Bruno, Deise, Thiago, Débora, Zé e Isa (III Turma de Ciências Biológicas), bixetes Helô e Naty; Liana, Andréia e Profa Fátima (Integral); Paulo Curio, PA, Karen, Dio, Alexandre, Maurício, Pirica, Andrea, Leda, Carolina, Farias, Wilson, José Ricardo e Profs do meu coração, Odila, Xico, Deise, Edi, Clélia, Ana, Clarete, Wagner e Bernadete (Pery), Marcel (hand), Rafael Aichinger, Renato, Thiago e Regina, Telcia e Marcel (e PH!), Roseli, Eduardo, Emerson, Cida, Otávio, Viviane, Rodrigo, Marivani, Edmilson, Gil, Michelle, Américo, Seu Geraldo (Itu), Maria Olívia (Araraquara).*

*E, finalmente, agradeço as **pessoinhas especiais**, que sempre me deram muito carinho e apoio: Tio Anselmo, primos Newton e Junior; Andrea, Clara, Bruno, Matheus, Tacília; cunhadinhas Mariana e Karina, cunhadinhos Bruno e Rodrigo; Tios Vande e Ivanilda; Damaris, Arnaldo, Fernanda, Rodrigo, Camila, Zeca, Eliana, Janaina, Bruno, Ana, Rosana, Giu, Gabi, André, Reinaldo, Florinha, Kadu, Zezé, Alessandro, Eugênia, Lucinha, Kiko, Kika, César, Fátima, Nilza, Claudia, Leila, Vera, Paola, Zezé, Moisés, Gim, Fabiana, Caio, Luizinho, Márcia e Nina!*

- 8 -

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas de estudos (DS e PDSE), à Pró-Reitoria de Pós-Graduação (ProPG) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro para participação em congressos.

Epígrafe



*Il buon senso c'era; ma se ne
stava nascosto, per paura
del senso comune.*

*O bom senso existia; mas
estava escondido, por medo
do senso comum.*

Alessandro Manzoni

Resumo



Resumo

Introdução: ao analisar as atuais causas dos óbitos das pessoas que vivem com HIV/aids (PVHA), diferentemente da era pré-cART (terapia antirretroviral combinada), destacam-se doenças típicas do envelhecimento, tais como dislipidemias, doenças cardiovasculares, diabetes *mellitus*, entre outras, que aparecem de forma muito precoce nesta população. Tal fenômeno ocorre devido às persistentes ativação imune e inflamação crônica em PVHA, que são favorecidas pela interação da HMGB1 - *high mobility group box protein-1* - e dos produtos finais de glicação avançada (AGEs), com seu receptor (RAGE), presente na superfície da membrana celular. Em sua forma solúvel, sRAGE é uma provável supressora da ativação imune por sequestrar os ligantes e evitar a interação deles com a forma transmembrana, anulando assim, seus efeitos. Além disso, a translocação microbiana e o estresse oxidativo têm sido estudados como potencializadores dessa cascata inflamatória e, em PVHA, níveis de sCD14 e de produtos de peroxidação lipídica, tais como o malondialdeído (MDA) e 8-isoprostano, estão elevados em relação aos indivíduos não-infectados, enquanto que o sistema antioxidante dos portadores do vírus, incluindo a capacidade antioxidante total (CAT), vitaminas e seus precursores, também é considerada deficiente. Portanto, esses marcadores estão relacionados, tanto com a própria evolução para a doença, quanto com o aparecimento e gravidade das comorbidades não-associadas a aids.

Objetivos: avaliar a influência da cART e das contagens de células T CD4⁺ nos níveis plasmáticos de sRAGE, AGEs, HMGB1, sCD14, citocinas, MDA, 8-isoprostano, CAT, vitaminas, proteína C-reativa (PCR) e variáveis metabólicas, além da relação com os danos genotóxicos induzidos por estresse oxidativo à partir das células mononucleares do sangue periférico das PVHA.

Métodos: a abordagem foi realizada em dois estudos, um longitudinal envolvendo 30 PVHA analisadas antes (M0) e cerca de seis a 12 meses após início terapêutico (M1) e, outro estudo de caráter transversal, que dividiu os 92 participantes em cinco grupos, conforme uso ou não da cART e resposta imunológica apresentada, sendo ela, adequada (T CD4⁺>500) ou inadequada (T CD4⁺<500 células/mm³). A inclusão dos participantes ocorreu no Serviço de Ambulatórios Especializados de Infectologia “Domingos Alves Meira”, Botucatu/SP. Foram realizadas as seguintes técnicas: cromatografia de alta eficiência (HPLC) para o MDA e vitaminas; *total antioxidant performance* para o CAT; ensaio imunoenzimático (ELISA) para o sRAGE, AGEs, HMGB1, sCD14 e 8-isoprostano; citometria de fluxo para as citocinas IL-6,

IL-8 e IL-10 e ensaio do Cometa para dano no DNA. Demais dados foram coletados de prontuários médicos. Na análise estatística foram utilizados, para as variáveis não paramétricas, os testes Poisson e Distribuição Gamma e, para as paramétricas, Binomial Negativa e Tukey-Kramer. Foram calculadas, também, correlações de Pearson. A análise foi ajustada para idade, gênero, prática de exercícios físicos, uso de tabaco e de antidepressivos. A significância foi considerada para $p \leq 0,05$.

Resultados: no estudo longitudinal os níveis de triglicérides e PCR aumentaram após terapia e, concentrações de vitaminas e CAT diminuíram neste período. Além disso, houve aumento no dano do DNA pós-cART nos indivíduos que iniciaram a terapia com altas contagens de T CD4+. Naqueles que a iniciaram com baixas contagens destas células, ocorreu aumento de 8-isoprostano e diminuição nos níveis de AGEs. Já no estudo transversal, os grupos sob cART há mais de cinco anos e controle da viremia apresentaram os menores níveis de IL-10, sendo que, entre eles, o grupo de indivíduos com contagens mais altas de T CD4+ mostrou os níveis mais elevados de sCD14 e sRAGE. Ademais, no grupo virgem de tratamento com baixas contagens de T CD4+ houve maior concentração de 8-isoprostano, enquanto que, naquele sem tratamento, mas com altas contagens de T CD4+ e infecção há mais de cinco anos, observou-se os menores danos genotóxicos.

Conclusão: o uso da cART influenciou na melhora dos parâmetros relacionados à infecção pelo HIV, porém, não houve benefícios no *status* inflamatório e de ativação imune, considerando os marcadores escolhidos. A cART parece, também, ter contribuído com o aumento no estresse oxidativo dos indivíduos infectados, tanto nos meses iniciais da terapia quanto seu uso em período prolongado, conforme demonstrado nos dois estudos. Assim, há necessidade de mais investigações, com maior casuística, sobre as alterações metabólicas, imunológicas e oxidativas provocadas pela cART. Além disso, devido à sua indicação cada vez mais precoce e uso prolongado, estratégias para minimizar estes parâmetros devem ser consideradas, tais como, adoção de hábitos saudáveis e acompanhamento periódico em Serviço de Referência.

Abstract



Abstract

Introduction: Analyzing the current causes of deaths of people living with HIV/AIDS (PLWHA), it turns out that, unlike the pre-cART era (combination antiretroviral therapy), the highlights are typical manifestations of aging, such as dyslipidemia, cardiovascular disease and diabetes *mellitus*, which appear early in this population. This phenomenon occurs because of persistent immune activation and chronic inflammation in PLWHA, which are favored by the interaction of HMGB1 (high mobility group box protein-1) and AGEs (advanced glycation end-products), with the receptor RAGE, present in surface of the cell membrane. In its soluble form, sRAGE competes with the transmembrane receptor sequestering its ligands and preventing the activation of proinflammatory pathways. Furthermore, microbial translocation and oxidative stress have been studied as enhancers of this inflammatory cascade. Compared to the non-infected individuals, in PVHA the sCD14 and product levels of lipid peroxidation, such as malondialdehyde (MDA) and 8-isoprostane are increased, while their antioxidant system, including the total antioxidant capacity (TAC), vitamins and their precursors are deficient. Therefore, these markers are related both to the evolution of the disease itself, as with the onset and severity of non-AIDS comorbidities.

Objectives: to evaluate the influence of cART and CD4⁺ T cells counts on plasma levels of sRAGE, AGEs, HMGB1, sCD14, cytokines, MDA, 8-isoprostane, TAC, vitamins, C-reactive protein (CRP) and metabolic variables, beyond their relationship with genotoxic damage induced by oxidative stress from peripheral blood mononuclear cells of PVHA.

Methods: the approach was made through two studies, a longitudinal design enrolled 30 PVHA, analyzed before (M0) and approximately six to twelve months after (M1) therapy initiation; another transverse study, which divided the 92 participants into five groups, as use or not of cART and the presented immune response (adequate when the CD4⁺ T <500, or inadequate to CD4⁺ T >500 cells/mm³). The participants included attending the Specialized Ambulatory Service of Infectious Diseases "Domingos Alves Meira", Botucatu/SP. The following techniques were performed: high performance liquid chromatography (HPLC) for the MDA and vitamins; total antioxidant performance for CAT; enzyme immunoassay (ELISA) to sRAGE, AGEs, HMGB1, sCD14 and 8-isoprostane; flow cytometry for IL-6, IL-8 and IL-10 and comet assay for DNA damage. Other data were collected from medical records. We used Poisson test or Gamma distribution for non-parametric variables and Negative Binomial or One-way ANOVA with subsequent Tukey-Kramer post-hoc test for

those parametric data. We also performed Pearson correlations. All calculations were adjusted for age, sex and tobacco use, practice of intense physical activity and use of anxiolytics and/or antidepressants ($p \leq 0.05$).

Results: In the longitudinal study, after cART initiation triglyceride and CRP levels increased, and vitamin concentrations and CAT decreased. In addition, there was an increase in DNA damage of individuals who initiated therapy with high CD4⁺ T counts. Those started with low CD4⁺ T counts, occurred an increase in 8-isoprostane levels and a decrease in AGEs. In cross-sectional study, the groups under cART for more than five years and controlled viremia had lower IL-10 levels, and those with higher CD4⁺ T cell counts showed higher levels of sCD14 and sRAGE. Moreover, the naïve group with low CD4⁺ T counts presented the highest concentration of 8-isoprostane, while naïve patients but with a high CD4⁺ T count and infection for more than five years, it was observed the smallest genotoxic damage.

Conclusion: the use of cART improved the parameters related to HIV infection, however, failed to improve the inflammatory and immune activation status, considering the variables analyzed here. The therapy also showed to increase the oxidative stress of infected individuals, both in the initial months as long-term use of cART, as shown in our both studies. Thus, there is need for further research with a larger cohort, about the disturbance in metabolic, immunological and oxidative status, potentiated by cART. In addition, because of the current ever-earlier recommendations to start cART and its prolonged use, strategies to minimize these parameters should be considered, such as adoption of healthy habits and regular monitoring in Reference Service.

Sumário



SUMÁRIO

Resumo /Abstract

CAPÍTULO I	1
Revisão da Literatura.....	1
HIV/Aids: Aspectos Gerais	1
Envelhecimento Precoce e Inflamação em PVHA	5
Estresse Oxidativo na Infecção pelo HIV	13
Justificativa do Estudo	21
Objetivos	22
Objetivo Geral	22
Objetivos Específicos	22
CAPÍTULO II	23
Desenho do Estudo	23
Sujeitos do Estudo	23
Delineamento.....	24
Marcadores e Técnicas	25
Referências	27
CAPÍTULO III	35
Artigo nº 1: The initial months of antiretroviral therapy and its influence on AGEs, HMGB1 and sRAGE levels in asymptomatic HIV-infected individuals	36
Artigo nº 2: Antiretroviral therapy initiation alters the redox system of asymptomatic HIV-infected individuals.	52
Artigo nº 3: Ativação Imune e Estresse Oxidativo em Indivíduos com Infecção Assintomática pelo HIV	72
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	97
ANEXOS	99
I - Termos de Consentimento Livre e Esclarecido	99
II- Ficha de Entrevista	101
III- Aprovação do CEP local	102
IV- Alteração de Título de Projeto de Pesquisa, nível doutorado.....	104

Capítulo I



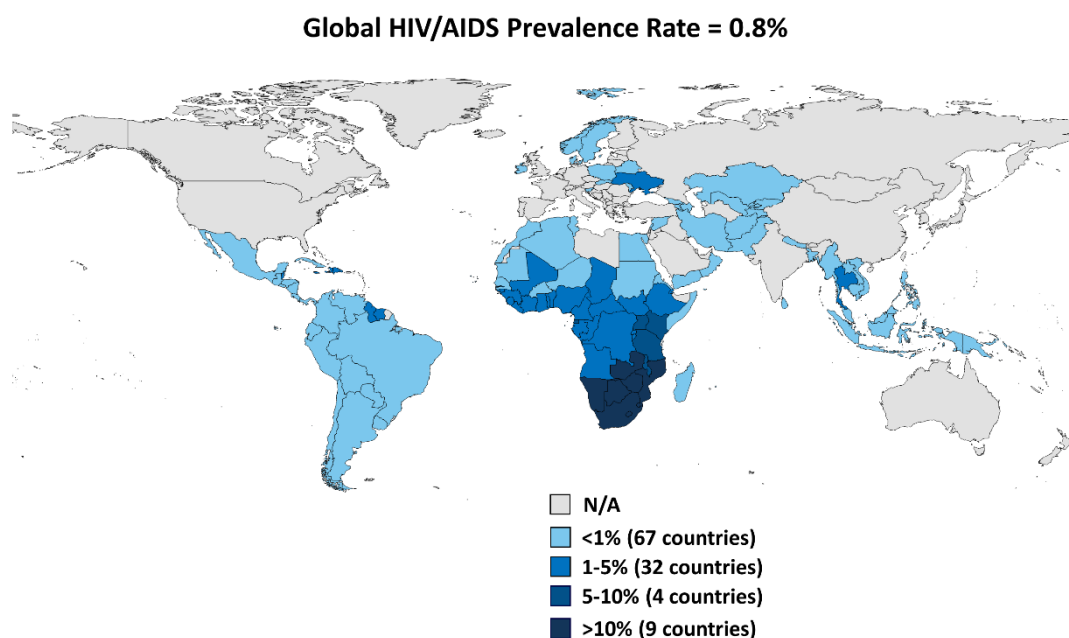
Capítulo I

Revisão da Literatura

- **HIV/Aids: Aspectos Gerais**

A Organização Mundial da Saúde estimou, em 2014, que a epidemia por HIV atingia 36,9 milhões de pessoas no mundo, com prevalência global de 0,8% (*figura 01*). Há mais de 30 anos a aids se mantém como importante causa de mortalidade, ocupando o 6º lugar no *ranking* mundial de óbitos, com cerca de 1,5 milhão de mortes em 2012 ^(1,2) (*figura 02*). No Brasil, desde o início da epidemia em 1981 até junho de 2014, foram registrados 757.042 casos no país, com prevalência estimada de 0,4%, distribuição concentrada nas regiões Sudeste e Sul e maior incidência em homens (65%) ⁽³⁾. Só no estado de São Paulo, 228.698 casos foram notificados de 1980 a junho de 2013 e, destes, o município de Botucatu representa 1.551 casos ⁽⁴⁾.

Adult HIV Prevalence Rate, 2014



NOTES: Data are estimates. Prevalence rates include adults ages 15-49.

SOURCE: Kaiser Family Foundation, based on UNAIDS, How AIDS Changed Everything; 2015.



Figura 01. Taxas de prevalência de adultos infectados pelo HIV no mundo.

Fonte: UNAIDS, 2015 ⁽¹⁾.

Tasca, K. I., 2016

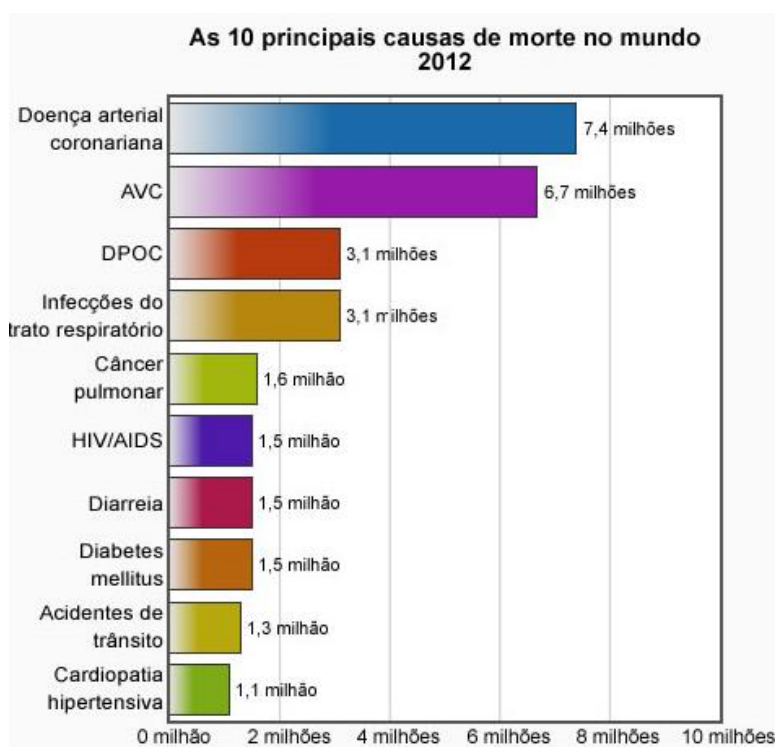


Figura 02. Dez principais causas de morte no mundo no ano de 2012.

Siglas: DPOC, doença pulmonar obstrutiva crônica; AVC, acidente vascular cerebral.

Fonte: WHO, 2014 ⁽²⁾.

Apesar da infecção por HIV ser considerada, atualmente, uma doença crônica devido aos avanços tecnológicos e de pesquisas relacionadas ao seu diagnóstico precoce e tratamento eficaz, ela ainda é emergente e representa um dos maiores problemas de saúde pública, em função do seu caráter pandêmico e de sua gravidade. Porém, o impacto dessa epidemia seria muito maior se a estratégia de combinação de diferentes drogas na terapia antirretroviral (cART), não tivesse mudado a história natural da doença, reduzindo drasticamente sua morbimortalidade ⁽¹⁾.

Em sua história natural, a infecção por HIV inclui as fases aguda (semanas a poucos meses), crônica ou assintomática (anos) e a aids, propriamente dita. O tempo de evolução para a doença após o contágio é de, aproximadamente, 10 anos, em indivíduos considerados “progressores típicos” e na ausência de cART (*figura 03*). No entanto, uma pequena parcela dos infectados (cerca de 5,0%) ⁽⁵⁾ permanece sem sintomas ou evidências clínicas de progressão por bem mais de 10 anos, sendo conhecidos como “progressores lentos” - LTNP (*long term non-progressors*). Esse é um grupo importante que permite o estudo de fatores associados ao controle do ritmo de progressão da doença, tais como, fatores genéticos, eficiência da resposta imune humoral e celular e a presença de fatores antivirais solúveis ^(6,7).

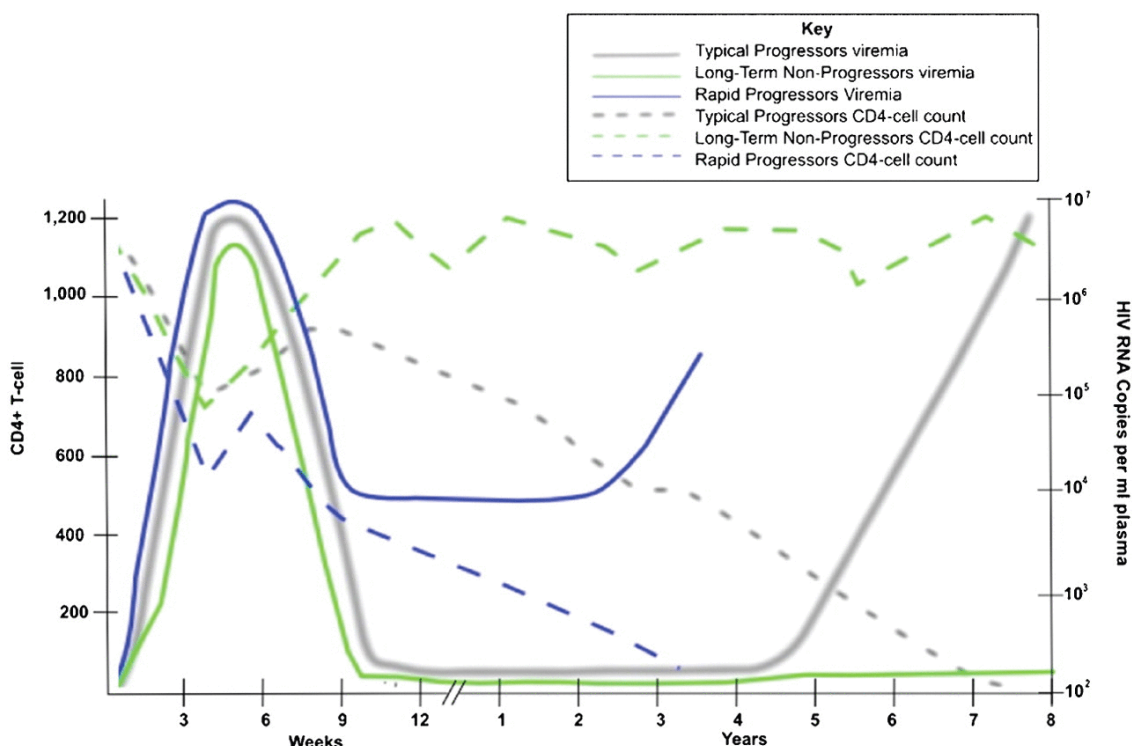


Figura 03. Progressão da infecção por HIV em progressores típicos (cinza), rápidos (azul) e lentos (verde).

Fonte: Poropatich K, Sullivan DJ, 2011 ⁽⁷⁾.

HIV são retrovírus que podem infectar vários tipos celulares, principalmente os linfócitos T com marcador CD4+ (T CD4+), que apresentam receptores de quimiocinas específicos, CCR5+ ou CXCR4, em sua superfície. Assim, o principal dano causado pelo HIV é a deterioração progressiva do sistema imune celular, levando a grave imunodepressão, o que torna o indivíduo mais suscetível às doenças oportunistas ou certos tipos de neoplasias ⁽³⁾. Além disso, algumas células infectadas permanecem latentes, mantendo pró-vírus integrados ao seu DNA, mas sem expressar proteínas virais, dando origem aos conhecidos “reservatórios virais”. Essa condição permanece até que esta célula seja estimulada/ativada, o que atrasa o combate do sistema imune contra o vírus ou dificulta a ação dos medicamentos antirretrovirais (ARV) disponíveis ^(8,9).

A eficácia do primeiro regime terapêutico e qual é o melhor momento para iniciá-lo são tópicos até hoje discutidos em todo o mundo e que geram muitas questões que, ainda, necessitam de respostas consistentes ⁽¹⁰⁾. Alguns estudos mais recentes, sugerem maior sobrevida ^(11,12) com o início precoce de cART e mais benefícios ao paciente, tais como melhor reconstituição imune ⁽¹³⁾. Quanto maior o *nadir*, cuja expressão é dada à menor contagem de T CD4+ ao longo da infecção, melhor prognóstico dos pacientes. Outros

benefícios do tratamento precoce seriam limitação da diversidade viral com redução do reservatório, protegendo os sistemas imunes, inato e adquirido, dos efeitos deletérios da ativação imune crônica⁽¹¹⁾ e diminuição da replicação do HIV, reduzindo, substancialmente, a sua transmissão^(14,15).

Desta forma, o Ministério da Saúde do Brasil que, até dezembro de 2013 indicava início terapêutico aos assintomáticos, apenas quando estes apresentavam T CD4+ inferior a 500 células/mm³, passou a recomendar o tratamento para todas as pessoas que vivem com HIV/aids (PVHA), independentemente dos níveis de T CD4+ e sintomatologia⁽¹⁴⁾.

Entre as classes de medicamentos disponíveis estão os inibidores de transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (ITRN), inibidores de transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos (ITRNN), inibidores de protease (IP), de fusão, de integrase e antagonista do correceptor CCR5, drogas que têm sido utilizadas associadas, compondo diferentes esquemas terapêuticos⁽¹⁴⁾.

Contudo, há um grupo de infectados sob cART e supressão viral completa por um longo período, que continuam apresentando reconstituição imune incompleta, ou seja, a contagem de T CD4+ se estabelece em níveis inferiores a 500 células/mm³. Esses são os chamados “não respondedores imunológicos” – NRI (ou INR, *immunological non-responders*). A patogenia deste fenômeno ainda não está clara, mas sabe-se que há redução na proliferação de células T CD4+ de memória, aumento na susceptibilidade a apoptose em linfócitos T, replicação viral residual e altos níveis de lipopolissacarídeo (LPS) e ativação imune^(13,16,17). Estas pessoas apresentam risco maior de morbimortalidade quando comparadas àquelas sob cART que conseguem a recuperação celular durante o curso da infecção⁽¹⁸⁾.

Fato é que, hoje em dia, garantido o acesso à cART e também a bons serviços de assistência à saúde, a expectativa de vida de uma PVHA se assemelha muito à da população geral, tornando a abordagem clínica da infecção pelo HIV muito semelhante à de outras doenças crônicas, com benefícios visíveis, principalmente, nos pacientes que têm adesão à terapia e ao acompanhamento no Serviço de Referência^(1,19).

• Envelhecimento Precoce e Inflamação em PVHA

Apesar das conhecidas vantagens da cART em longo prazo, como os benefícios clínicos que são decorrentes, principalmente, do controle na replicação do HIV, o início terapêutico tem ocorrido cada vez mais cedo na população de infectados. Devido a este fato, têm ocorrido também mais precocemente, eventos adversos causados pelos ARV, tais como, citotoxicidade e transtornos metabólicos ⁽²⁰⁾.

Analisando as causas atuais dos óbitos das PVHA, diferentemente da era pré-cART, as infecções oportunistas são responsáveis apenas por uma pequena parcela deles. Destacam-se agora doenças típicas do envelhecimento, tais como, doença cardíaca isquêmica, acidente vascular encefálico e outras alterações do sistema nervoso central, dislipidemias, hepatopatias, doença renal crônica, diabetes *mellitus*, alterações ósseas, infecções e cânceres não relacionados à aids, entre outras ⁽²¹⁻²⁷⁾. Estas comorbidades são mais frequentes em indivíduos infectados por HIV, do que os não infectados ⁽²⁸⁾ (*figura 04*).

Essas doenças crônicas, muito comuns em idosos da população geral, acometem mais cedo as PVHA ⁽²²⁾, caracterizando o “envelhecimento precoce”. Exemplo disso é que, uma PVHA de 40 anos apresenta número semelhante de comorbidades ao de um indivíduo não infectado com cerca de 60 anos ⁽²²⁾ (*figura 05*).

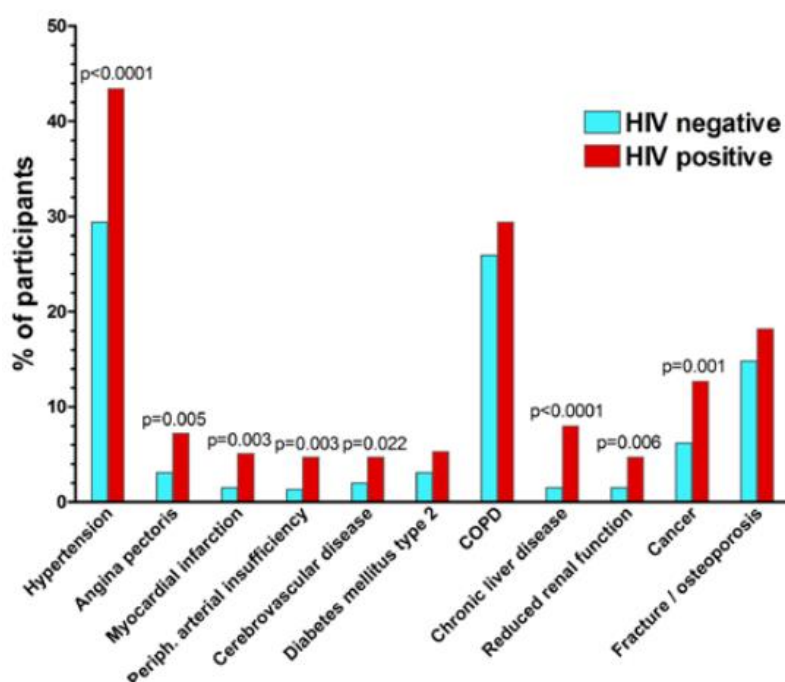


Figura 04. Distribuição de comorbidades em indivíduos portadores ou não do HIV.

Sigla: COPD, chronic obstructive pulmonary disease.

Fonte: Schouten J et al., 2012 ⁽²⁸⁾.

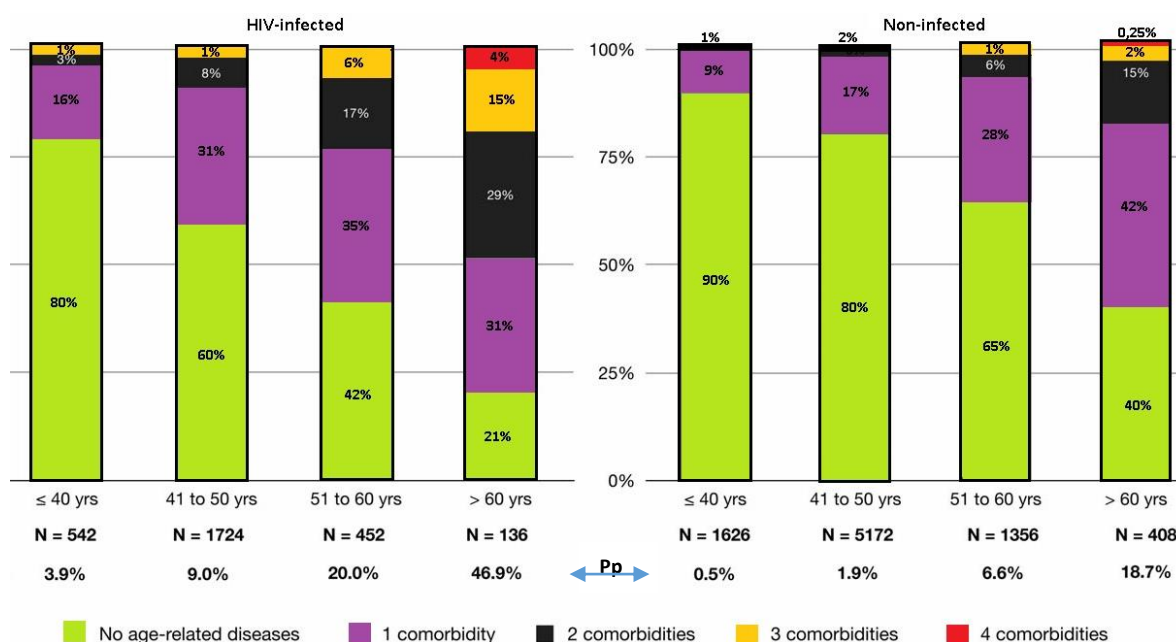


Figura 05. Prevalência de “polipatologias” (Pp) entre infectados e não infectados pelo HIV, por faixa etária.

Comorbidades: hipertensão, diabetes *mellitus*, hipotireoidismo, doenças cardiovasculares e fraturas ósseas.

Fonte: Guaraldi G *et al.*, 2011⁽²²⁾.

Muitos fatores fisiopatológicos estão envolvidos com o aparecimento deste fenômeno. Os maus hábitos de vida, tais como, tabagismo, sedentarismo, alimentação desbalanceada e estresse, a influência genética e/ou familiar e a presença de alguns patógenos, como citomegalovírus e vírus das hepatites B (VHB) e C (VHC) podem agravar essas comorbidades⁽²⁶⁾. No entanto, o processo inflamatório crônico apresentado por indivíduos infectados pelo HIV, talvez, seja um dos mais importantes mecanismos desencadeadores do envelhecimento precoce. Essa inflamação persistente em PVHA deve-se, principalmente, à constante replicação residual do HIV, à translocação microbiana e à intensa ativação do sistema imune^(29,30) (figura 06).

De modo mais detalhado, além da desregulação das subpopulações de células T *helper* (Th)1 e Th2, bem conhecidas na infecção por HIV⁽³¹⁾, outro perfil de respostas é diminuído em PVHA, o Th17. Este tipo de resposta contribui para a homeostase no tecido linfóide associado ao intestino (GALT), pois previne a inflamação local, a perda da integridade e alterações na estrutura e função dessa mucosa ou da flora bacteriana. Como consequência, há menor risco de ruptura da barreira epitelial^(32,33) dificultando a translocação microbiana do lúmen intestinal para o sangue periférico^(33,34). Na falha desse processo ocorreria ativação

imune sistêmica ⁽²⁹⁾, promovendo aumento da inflamação e comprometendo ainda mais o *status* clínico das PVHA.

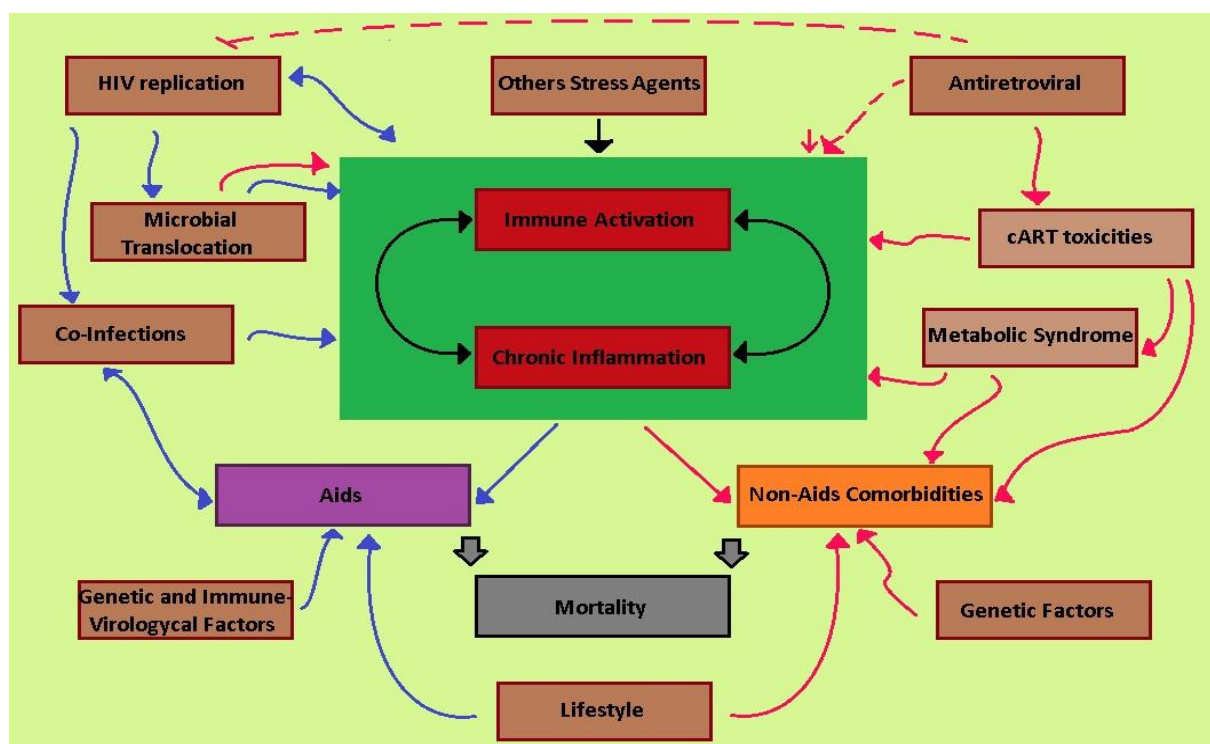


Figura 06. Mudança de cenário das causas de morte em infectados pelo HIV, pré- (azul) e pós- (rosa) cART.

Fonte: Adaptado de Hsu *et al.*, 2013 ⁽²⁹⁾; Hunt, 2012 ⁽³⁵⁾.

A translocação microbiana é mais intensa em indivíduos PVHA ^(34,36) e pode ser identificada pelas dosagens plasmáticas de CD14 solúvel (sCD14), que se liga ao LPS e ativa o fator de transcrição nuclear *kappa*-B (NF-κB), com consequente produção intensa de citocinas pró-inflamatórias ⁽³⁴⁾.

Além disso, as respostas adaptativas contra o HIV, principalmente, a de linfócitos T citotóxicos (CTL) específicos, suprimem a replicação viral, mas contribuem igualmente para o aumento da ativação imune crônica ⁽³⁷⁾. A ativação celular de T CD8+ nos indivíduos infectados tem sido relacionada à diferenciação atípica na população de células T ⁽³⁸⁾, devido a um processo que envolve a via de sinalização “proteína quinase ativada por mitógenos” (MAPK) ⁽³⁹⁾. Esta via também contribui com a patogênese da doença, pois é ativada em resposta a estímulos contínuos de estresse e ao ambiente pró-inflamatório. Muitas das etapas do ciclo replicativo do HIV parecem depender desse estímulo de mitógenos, como o desbloqueio da transcrição reversa e integração completa do DNA pró-viral ⁽⁴⁰⁾.

Outros marcadores estão relacionados à ativação celular. Assim, os produtos finais de glicação avançada (AGEs) são resultados de reações não enzimáticas entre açúcares redutores e componentes celulares, incluindo proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos que se acumulam no tecido vascular durante o envelhecimento ⁽⁴¹⁾. Tais produtos interagem com seus receptores (RAGE), membros da superfamília das imunoglobulinas que estão expressos na membrana de vários tipos celulares ⁽⁴¹⁾. A expressão de RAGE aumenta em consequência do acúmulo de seus ligantes, como AGE, HMGB1 (*high mobility group box protein 1*) e mediadores inflamatórios ⁽⁴²⁾.

Quando essa ligação entre produtos e receptor acontece, vias celulares pró-inflamatórias e pró-coagulantes são ativadas, o que aumenta a produção de moléculas de adesão, de citocinas inflamatórias como a interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral α (TNF- α), além da geração de óxido nítrico (NO), que contribuem com várias condições patológicas graves, incluindo o desenvolvimento de aterosclerose, diabetes *mellitus*, sepse, artrite reumatoide, doenças neurológicas, entre outras ⁽⁴³⁻⁴⁷⁾. A forma solúvel de RAGE (sRAGE), em contrapartida, atua como supressora da ativação e sinalização de RAGE, por sequestrar seus ligantes e impedir a interação ligante-RAGE e seus efeitos ⁽⁴⁸⁾ (figura 07).

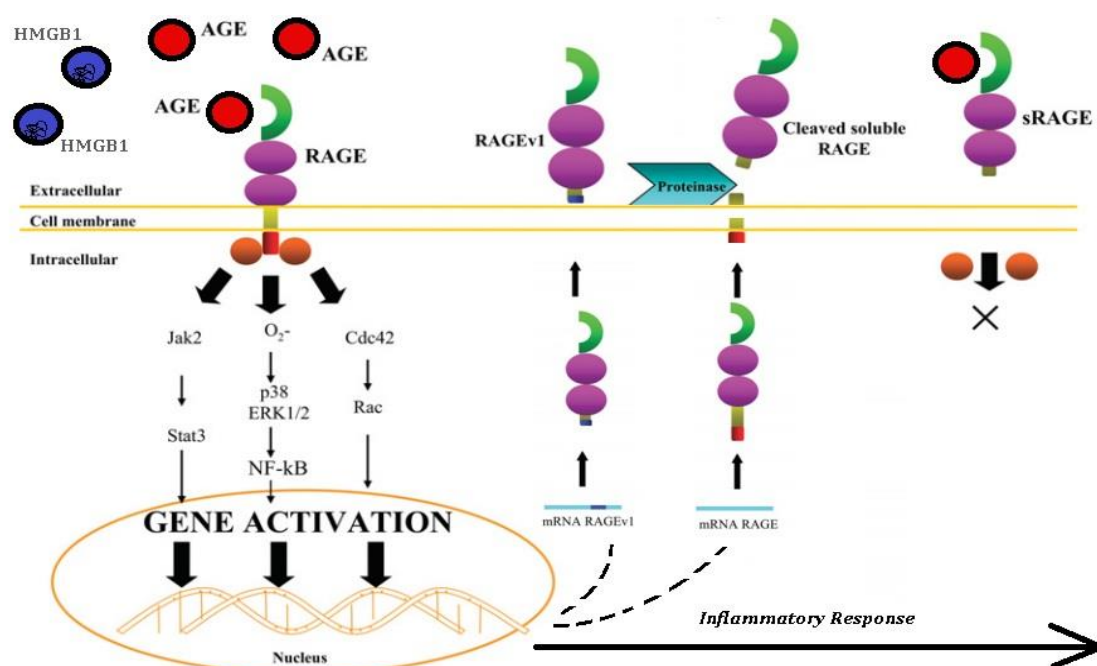


Figura 07. Cascata inflamatória decorrente da ativação de RAGE, devido a interação com seus ligantes AGE e HMGB1.

Siglas: AGE, produtos finais de glicação avançada; RAGE, receptor de AGE; HMGB1, high mobility group box protein-1.

Fonte: Adaptado de Kalea et al., 2009 ⁽⁴⁸⁾.

Jeonga *et al.* ⁽⁴⁵⁾ em estudo realizado com indivíduos infectados pelo HIV concluíram que altos níveis de sRAGE estiveram relacionados ao menor desenvolvimento de aterosclerose e sugeriram o papel protetor deste marcador, que poderia ser utilizado na prática clínica para prever riscos cardiovasculares nas PVHA. Neste mesmo estudo, não houve diferença entre os grupos de acordo com a classe de ARV utilizada, no entanto, grande parte dos pacientes com altas dosagens de sRAGE estava sob regime de cART composto por ITRNN ⁽⁴⁶⁾.

Elevados níveis sistêmicos de HMGB1 foram reportados em condições pró-inflamatórias crônicas, incluindo diversas comorbidades ^(47,49,50). A HMGB1, considerada uma alarmina, tem sua produção desencadeada por vários tipos celulares a partir de diferentes estímulos, como de LPS, *interferons* (IFN) e TNF- α ⁽⁵¹⁾ ou ela é secretada passivamente, como resultado de processos apoptóticos e de necrose ⁽⁵²⁾, condições que são comuns em indivíduos infectados pelo HIV.

Assim, altos níveis de HMGB1 também foram encontrados em PVHA, em relação à população não infectada e, principalmente, em pacientes com doença avançada ^(52,53). Os mesmos autores mostraram associação deste marcador com a carga viral plasmática (CV) dos pacientes e redução de ambos após dois anos de cART ⁽⁵²⁾. Um achado interessante é que a HMGB1 pode se ligar ao LPS, desagregando-o e facilitando, então, sua ligação com CD14, que ativa a célula via *toll like receptor 4* (TLR4) ⁽⁵⁴⁾ e, por seguinte, NF κ B ^(52,53). Estímulo de monócitos com LPS e HMGB1 em conjunto resultou em maior produção de TNF- α do que o estímulo apenas com LPS ⁽⁵⁴⁾. Isso indica que a HMGB1 pode, inclusive, induzir a reativação de HIV em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de indivíduos sob cART ⁽⁵⁵⁾.

Como um fator limitante das respostas pró-inflamatórias, a IL-10 tem sido relacionada sob diversos aspectos na patogenia do HIV/Aids e pode induzir resposta do perfil T regulatório (Treg). Alguns autores consideram que a IL-10 pode exercer papel protetor no hospedeiro, em virtude desse papel regulador de vários perfis efetores de células T e devido a sua indução de proteínas supressoras da ativação de T CD4+, como a proteína de morte celular programada (PD-1) ⁽⁵⁶⁾. Outros, encontraram correlação negativa entre esta citocina e T CD4+ ⁽⁵⁷⁾ e a associaram com o perfil Th2 e, conseqüentemente, com a evolução para aids ⁽⁵⁸⁾. Assim, mais estudos são necessários para verificar a ação da IL-10 na condição crônica da infecção pelo HIV.

Outros parâmetros de inflamação estão envolvidos na mortalidade desta população, como a proteína C reativa (PCR), IL-6, d-dímero, entre outros ⁽⁵⁹⁾. Estes e outros parâmetros têm sido relacionados, também, ao aparecimento de outras patologias, independentemente

da infecção pelo HIV ou como consequência do envelhecimento precoce. Exemplos típicos são as citadas no início deste tópico, principalmente doenças cardiovasculares, dislipidemias, hepatopatias, doença renal crônica, diabetes *mellitus* alterações ósseas e neoplásicas, e doença de Alzheimer e Parkinson ⁽⁶⁰⁾.

Em relação às neoplasias, atenção especial deve ser dada ao seu diagnóstico precoce, afinal, elas eram responsáveis por menos de 1% dos óbitos dos pacientes HIV na era pré-cART, e hoje alcançam 15% ⁽⁶¹⁾. O câncer, em geral, é relacionado com a instabilidade de mecanismos de reparo do DNA e as PVHA apresentam esse comprometimento ⁽⁶²⁾, conforme explanado mais adiante. Os mais comuns são os cânceres de pele, pulmão, colorctal/anal, hepático e linfoma de Hodgkin's ^(61,63) e estão relacionados a estágios avançados da infecção pelo HIV, ao *nadir* menor que 200 células/mm³, uso de cART, idade maior que 45 anos, e vêm acometendo mais o gênero feminino ^(61,63).

Aliás, de acordo com vários estudos ^(26,35,64,65), as persistentes ativação imune e inflamação são fatores potencialmente determinantes de morbidade e mortalidade não associadas à aids, mesmo nos indivíduos sob cART e que apresentam supressão viral adequada. A cART tem mostrado diminuir relativamente os níveis de alguns marcadores de inflamação, no entanto, esses valores continuam significativamente mais elevados nestes indivíduos do que naqueles não-infectados ^(26,65). Isso porque a cART, responsável pela lipodistrofia, dislipidemia e resistência da insulina, também desencadeia disfunções endoteliais ⁽²⁶⁾.

A soroconversão por si só, já altera o perfil metabólico dos pacientes (*figura 08*), mas de uma forma um pouco diferente: está associada à redução dos níveis lipídicos devido à perda de peso e depleção de proteínas. No entanto, com o início e manutenção da cART, em longo prazo, esses níveis se elevam ⁽⁶⁶⁻⁶⁹⁾. Sabe-se, inclusive, que a dislipidemia encontrada nos pacientes infectados por HIV é maior do que na população de não-infectados e se caracteriza por níveis elevados de triglicérides e colesterol total, e baixos da fração HDL-colesterol ⁽⁷⁰⁾. Uma vez iniciada a cART, observa-se que 33,0% a 82,0% dos pacientes desenvolvem hipercolesterolemia e 43,0% a 66,0% hipertrigliceridemia ⁽⁶⁷⁾, alterações que contribuem com o aparecimento de doenças cardiovasculares nesses pacientes ⁽²⁷⁾.

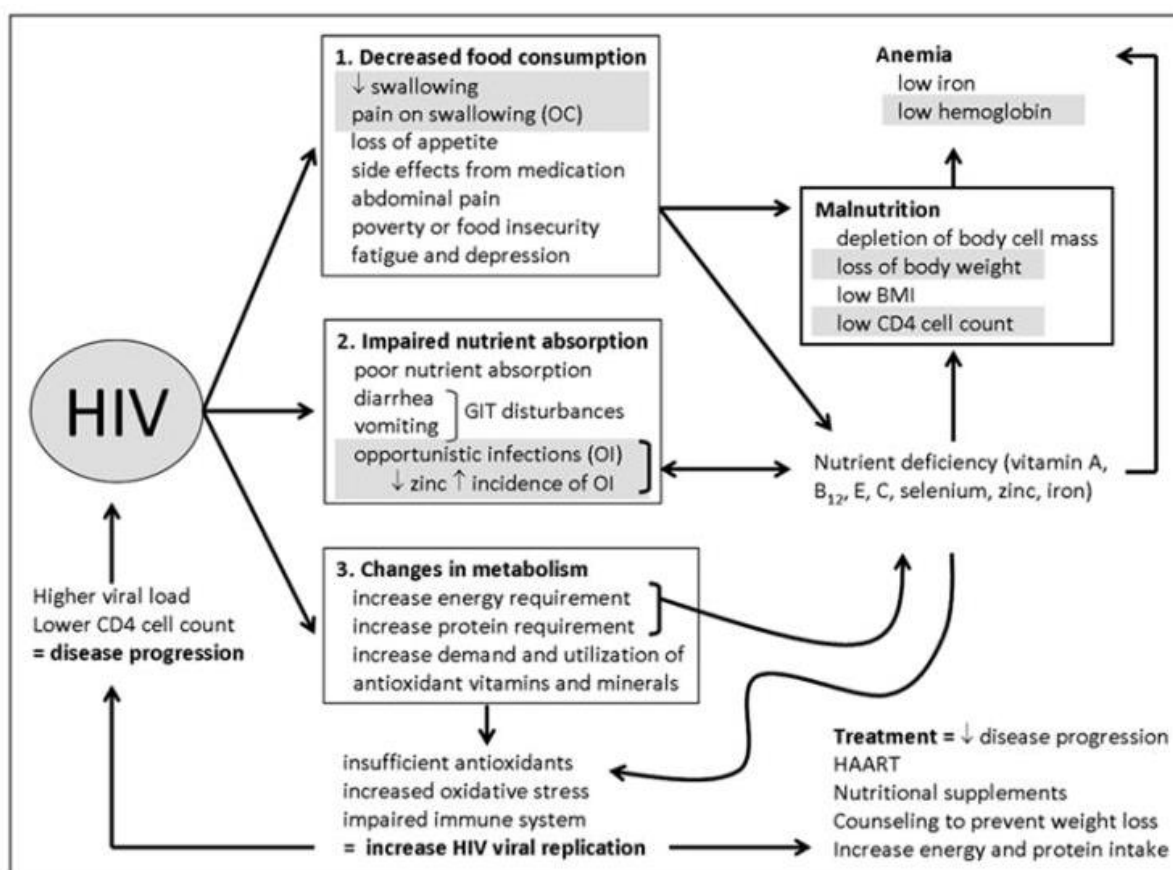


Figura 08. Interação entre *status* nutricional e progressão da infecção por HIV.

Fonte: Evans et al., 2011⁽⁶⁹⁾.

É preciso, então, que tais parâmetros sejam minimizados a fim de aumentar a sobrevida dos pacientes. Assim, há necessidade de mais estudos sobre os fatores que resultam e decorrem dessa persistente inflamação e ativação imune crônica, que contribuem com o envelhecimento precoce, inclusive, do sistema imunológico (*figura 09*)^(26,65). Nesse sentido, a senescência é marcada pela capacidade reduzida de células produtoras de IL-2, aumento na produção de IL-6, resistência a apoptose e encurtamento de telômeros. Uma das explicações é a inibição da telomerase por alguns ARV, afinal, ela é uma transcriptase reversa, e tem a função de adicionar sequências repetitivas de DNA à extremidade 3' dos cromossomos. A exaustão clonal também é muito mais intensa em infectados pelo HIV e um exemplo disso é que, mais de metade de todas as células T CD8⁺ estão ativadas em portadores de vírus e, apenas, 10% ou menos estão ativadas em pessoas sem o HIV, além das células T de um infectado com 56 anos de idade apresentar características semelhantes às de uma pessoa não infectada com 88 anos⁽⁶⁵⁾.

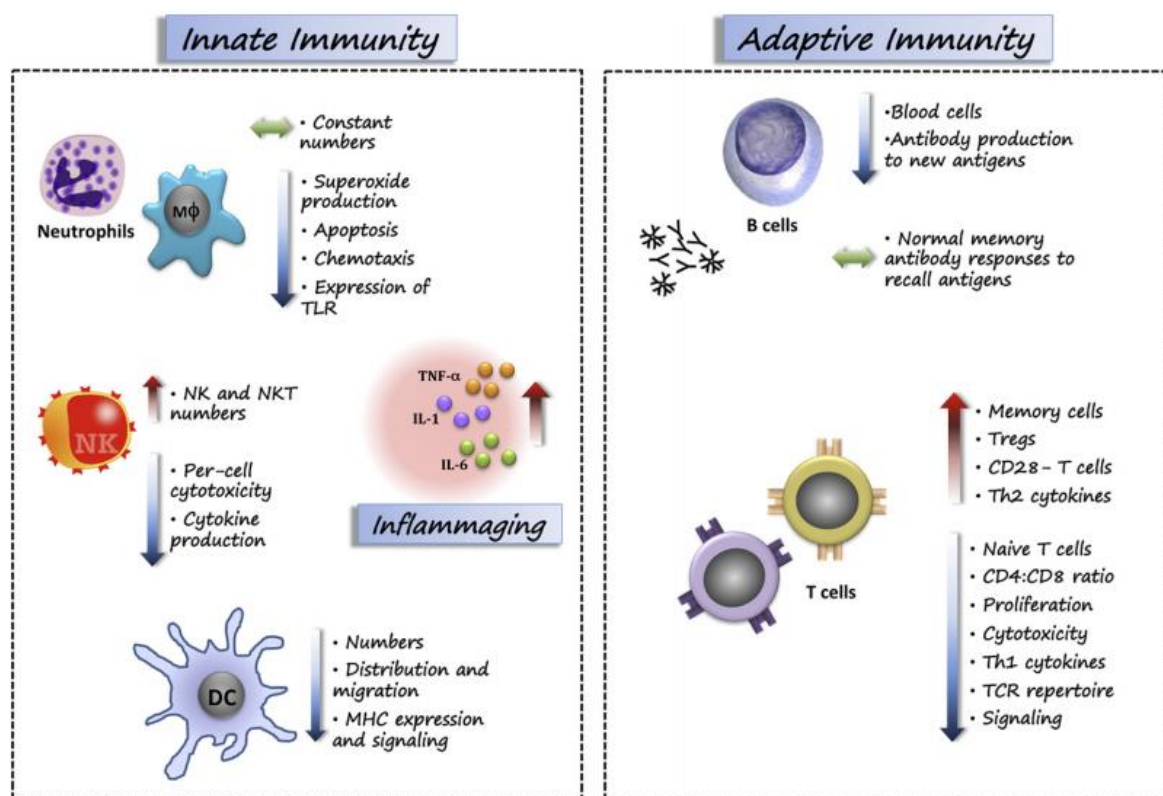


Figura 09. Sumário das alterações mais comuns decorrentes da imunossenescência.

Siglas: Mo, macrophage; DC, dendritic cell; MHC, major histocompatibility complex; TLR, Toll-like receptors; NK, natural killer; Th, helper T cell; TCR, T-cell receptor; Treg, regulatory T cell.

Fonte: Bauer ME & De la Fuente M., 2016 ⁽⁷¹⁾.

Para finalizar este tópico que relata a “nova cara da epidemia”, outros fatores explicam o aparecimento das comorbidades não-associadas e o envelhecimento precoce nas PVHA. Como a mortalidade pela infecção por HIV/Aids teve acentuada queda, há também o envelhecimento esperado dessas PVHA, além de um crescente aumento nas taxas de transmissão do HIV em idosos, fruto da baixa adesão aos preservativos e acesso a drogas de combate à disfunção erétil masculina nessa faixa etária ⁽⁷²⁾.

• O Estresse Oxidativo na Infecção pelo HIV

O conceito de estresse oxidativo, recentemente redefinido, é dado como desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, originando a desregulação da sinalização e controle *redox* (redução-oxidação), levando a possíveis danos moleculares ⁽⁷³⁾. Como consequências desta disfunção, ocorre acometimento estrutural e funcional de lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos e outras macromoléculas sendo que, a extensão dos danos gerados dependem da natureza, duração e gravidade do estímulo, que são variados entre diferentes espécies e tecidos ^(74,75). Em síntese, a *figura 10* apresenta alguns dos antioxidantes e oxidantes, fontes geradoras de substâncias reativas e possível resposta celular às condições que resultariam no estresse oxidativo.

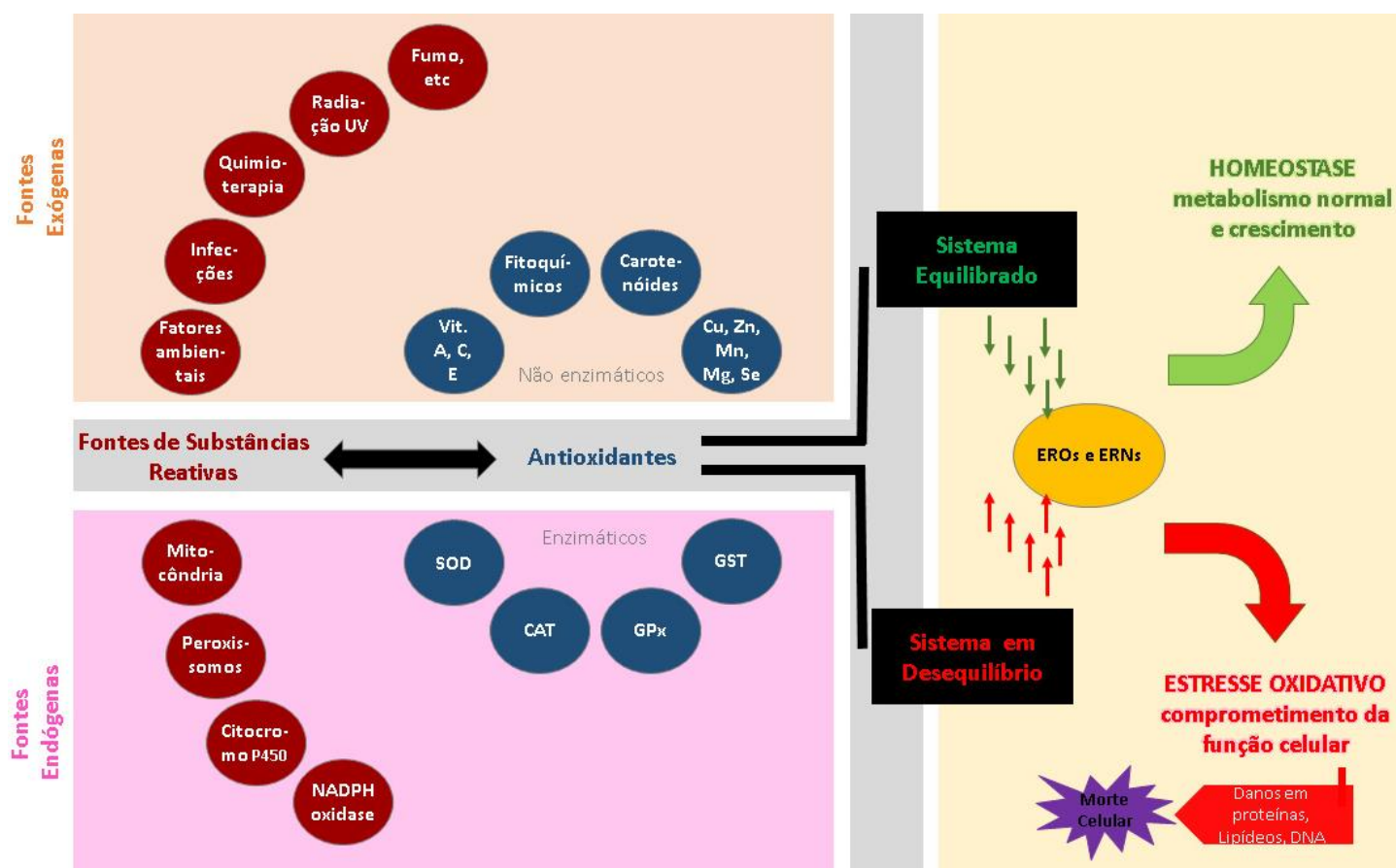


Figura 10. Relação dos componentes que participam do estresse oxidativo.

Siglas: UV, ultravioleta; Cu, cobre; Zn, zinco; Mn, manganês; Se, selênio; Mg, magnésio; SOD, superóxido dismutase; CAT, catalase; GPx, glutathione peroxidase; GST, glutathione s-transferase; EROs, espécies reativas de oxigênio; ERNs, espécies reativas de nitrogênio.

Fonte: Adaptado de: Halliwell & Whiteman ⁽⁷⁶⁾, Barbosa *et al.* ⁽⁷⁷⁾ e Sharma ⁽⁷⁸⁾.

Os produtos gerados pelo estresse oxidativo desempenham importante papel na gênese de processos metabólicos que culminam na ocorrência de enfermidades crônicas degenerativas. Tal capacidade, torna-os importantes ferramentas na elucidação de mecanismos e implicações biológicas do dano oxidativo, com o objetivo de possibilitar o planejamento de ações eficazes no controle e prevenção desses processos ^(79,80). No entanto, as lesões oxidativas são detectáveis sob condições fisiológicas normais em indivíduos saudáveis, o que sugere que a eficácia dos mecanismos antioxidantes e de reparo não podem evitar completamente a reação de oxidação mediada pelas espécies reativas de oxigênio (EROs) ⁽⁸¹⁾.

Tais EROs, apesar de contribuírem com a destruição de patógenos e de células tumorais, estão associados ao envelhecimento e aumentam ainda mais o estresse oxidativo e os danos teciduais, que desencadearão a inflamação. Este processo é conhecido como *oxi-inflamm-ageing*, e que também decorre da imunossenescência, independentemente da presença ou não de patógenos, e pode ser responsável pela indução de DAMPs, comprometendo ainda mais a homeostase local ⁽⁷¹⁾ (figura 11).

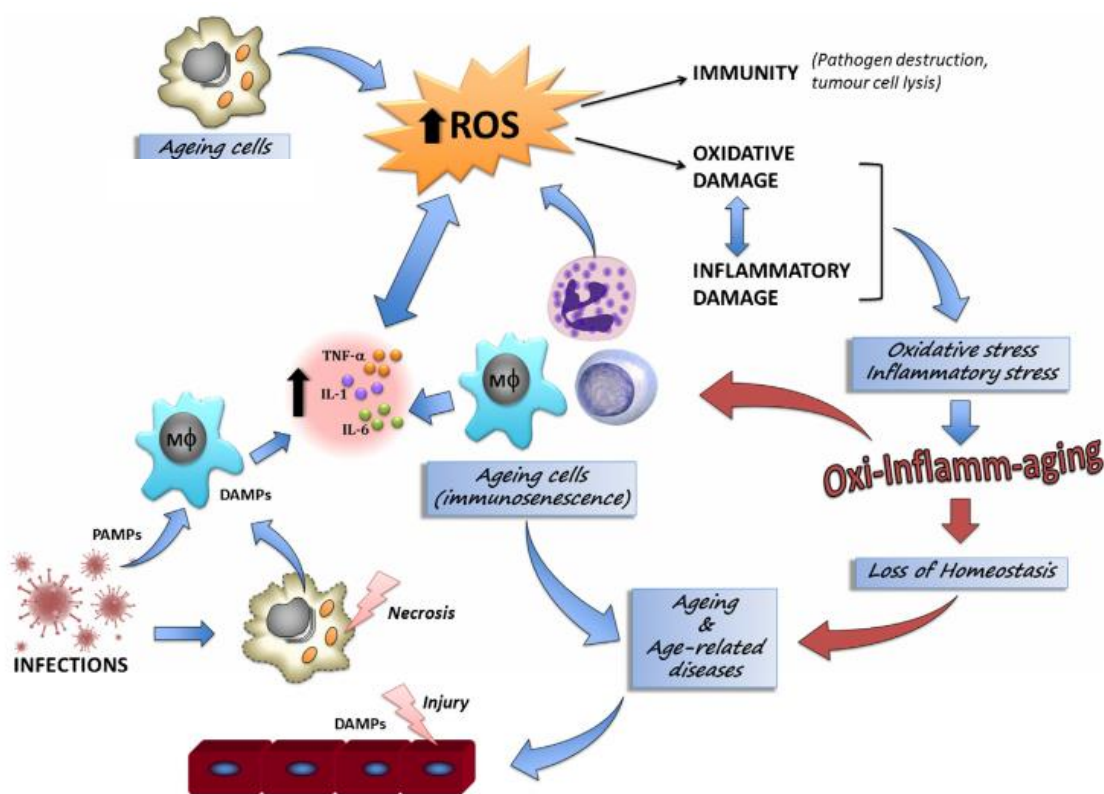


Figura 11. Relação dos componentes que participam do estresse oxidativo.

Siglas: ROS, reactive oxygen species; PAMPs, pathogen-associated molecular patterns; DAMPs, damage-associated molecular patterns.

Fonte: Adaptado de: Bauer ME & De la Fuente M., 2016 ⁽⁷¹⁾.

Vários métodos são utilizados para avaliar o estado pró-oxidativo, destacando-se as aferições, individualizadas ou em conjunto, que seguem: oxidação das bases púricas e pirimídicas do DNA, peroxidação lipídica (análise da concentração de malondialdeído [MDA] e nível de isoprostanos, por exemplo) e oxidação de proteínas (carbonilação, nitração). Outros ensaios avaliam a capacidade antioxidante, como a análise de enzimas específicas (superóxido desmutase, catalase etc.), glutatonas (GSHs), de componentes hidrofílicos (ácido úrico, bilirrubina, albumina, ascorbato, complexo B) e lipofílicos (carotenoides, α -tocoferol).

Entretanto, há dificuldade na interpretação dos resultados originados dessas medidas individuais, tanto de compostos antioxidantes, quanto de produtos oriundos das reações oxidativas⁽⁷⁶⁾. Além disso, deve-se considerar que a avaliação do potencial antioxidante de alguns componentes não-enzimáticos, *in vivo*, depende da absorção e biodisponibilidade do produto em condições fisiológicas; concentração plasmática ideal para desempenhar sua atividade antioxidante; tipos de radicais livres gerados no processo oxidativo; compartimento celular em que foram gerados, entre outros⁽⁷⁷⁾.

Na análise de antioxidantes, Beretta *et al.*⁽⁸²⁾ desenvolveram um método analítico e específico denominado TAP (*total antioxidant performance*), capaz de aferir a atividade antioxidante tanto do compartimento lipofílico quanto do hidrofílico. Em relação aos outros marcadores de estresse oxidativo, o TAP apresenta várias vantagens, pois determina a capacidade antioxidante total plasmática de ambos os compartimentos, propicia o nível de oxidabilidade da amostra e possui boa reprodutibilidade.

Os carotenoides também vêm sendo estudados ao longo dos anos não somente pela sua comprovada atividade pró-vitamina A, mas também pela evidência de outras propriedades biológicas benéficas à saúde, tais como, fortalecimento do sistema imunológico e diminuição do risco de doenças degenerativas, como certos tipos de neoplasias, doenças cardiovasculares, degeneração ocular etc⁽⁸³⁾. Da mesma forma, o α -tocoferol também tem papel essencial na proteção antioxidante. A separação desses compostos é comumente realizada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)⁽⁸⁴⁾, uma técnica sensível para a caracterização, sendo que a espectroscopia de massa pode ser a ela acoplada.

O MDA é um produto secundário da peroxidação lipídica, considerado um candidato potencial como um biomarcador geral de dano oxidativo em plasma⁽⁸⁵⁾. Para sua análise, a técnica HPLC é a mais indicada por ser capaz de medir unicamente o MDA, pois métodos mais antigos determinados por espectrofotometria, como o ensaio de TBARS (*thiobarbituric*

acid reactive substances) medem todas as substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico⁽⁷⁶⁾.

Outro marcador do estresse oxidativo baseado na peroxidação lipídica, consiste na aferição dos isoprostanos, compostos derivados da ação de radicais livres sobre os ácidos graxos polinsaturados. Entre a subclasse denominada F2-isoprostanos, derivada do ácido araquidônico, o mais abundante é o “PGF2-alfa-8-isoprostano”, que vem sendo proposto como um bom marcador do dano oxidativo de lipídios⁽⁷⁹⁾. Sua medida, tanto na urina quanto no plasma, não é influenciada pela dieta⁽⁸⁶⁾ e os isoprostanos seriam um dos melhores marcadores da lipoperoxidação lipídica *in vivo*, se não fosse por suas concentrações muito baixas em fluidos biológicos, como o soro⁽⁸⁷⁾ e se sua formação não fosse influenciada por metabolismos lentos⁽⁷⁶⁾. Entre as técnicas mais utilizadas para sua dosagem, está o ensaio imunoenzimático (ELISA), de fácil execução e que requer pequenos volumes da amostra.

E, finalmente, para se analisar os efeitos genotóxicos induzidos por estresse oxidativo, o ensaio do Cometa é um dos mais utilizados, devido ao seu baixo custo e versatilidade. Através desta técnica é possível a avaliação de dano do DNA celular em nível individual, empregando-se amostras celulares extremamente pequenas. Para isso, são utilizadas as enzimas de reparo formandipirimidina-DNA glicosilase (FPG), que cliva 8-oxi-7-hidroxidesoxiguanosina e outras purinas oxidadas, e endonuclease III (END), uma timina glicol-DNA glicosilase que detecta pirimidinas oxidadas.

Um fato observado em várias coortes de indivíduos infectados pelo HIV, foi o desequilíbrio *redox* que eles apresentam em comparação a indivíduos não-infectados, com deficiência do sistema protetor antioxidante e altos níveis de produtos oxidantes em vários tecidos⁽⁷⁸⁾. O próprio HIV é responsável por inibir indiretamente a síntese de alguns antioxidantes⁽⁸⁸⁾ e isso é intensificado pelo efeito pró-oxidante de citocinas inflamatórias e/ou da ativação leucocitária de polimorfonucleares, o que leva ao aumento ainda maior na peroxidação lipídica⁽⁸⁹⁾. Com esse desequilíbrio, há o acometimento estrutural/ funcional das organelas e enzimas, bem como da própria célula de defesa, o que acelera ainda mais a progressão para a aids^(90,91).

A proteína do HIV *tat*, devido à geração de ânion superóxido pela mitocôndria, induz a produção intracelular de EROs que, por sua vez, ativa o NFκB, aumentando a transcrição do HIV⁽⁹²⁾, além de induzir deficiência no reparo do DNA⁽⁶²⁾. Por isso, esses danos celulares podem induzir, também, a reativação dos vírus latentes, aparecimento de neoplasias, além de estimular a produção de algumas citocinas inflamatórias, como TNF-α^(62,93), o que contribui

com esse ciclo de “inflamação crônica *versus* ativação imune persistente *versus* estresse oxidativo” em pessoas que vivem com o HIV/aids.

Tal desequilíbrio leva ao aumento ainda maior da peroxidação lipídica ⁽⁹⁴⁾, proteínas oxidadas, sequências de DNA alteradas e ao acometimento estrutural/ funcional das organelas e enzimas, bem como da própria célula de defesa, o que acelera ainda mais a progressão para a aids ^(81,95). Afinal, além do aumento na replicação viral, da resposta inflamatória, e a diminuição da proliferação celular, o estresse oxidativo pode contribuir também com o aparecimento de muitas comorbidades não associadas à aids ⁽⁷⁸⁾.

Assim, considera-se que citocinas inflamatórias e/ou a intensa ativação leucocitária de polimorfonucleares, processos comumente observados na infecção pelo HIV, apresentam efeito pró-oxidante. Para combater os danos oxidativos, induzidos por esse alto nível de EROs, há elevado consumo de moléculas antioxidantes que, em parte, explica a deficiência nos sistemas antioxidantes nestes pacientes ⁽⁸¹⁾. Outras explicações baseiam-se na falta de ingestão de antioxidantes ou seus precursores, na má absorção de nutrientes e no intenso metabolismo da cisteína no tecido periférico, com consequente perda de enxofre, que pode levar à deficiência de glutatona e outros antioxidantes durante a infecção pelo HIV ⁽⁸¹⁾. Foram relatadas na literatura, atividades alteradas de capacidade antioxidante total nesses pacientes ⁽⁹⁰⁾ e concentrações reduzidas, tanto do sistema enzimático ^(81,96), quanto não-enzimático, como os níveis de vitaminas antioxidantes séricas (A, C e E) ⁽⁹⁰⁾ e alguns micronutrientes (zinco, ferro e cobre) ^(90,95,97). Esta diminuição foi relacionada, ainda, com baixas contagens de T CD4+, podendo acelerar a progressão da infecção para aids e morte ^(90,98).

Também são encontrados no plasma desses indivíduos infectados pelo HIV, produção elevada de marcadores de estresse oxidativo, como hidroperóxidos totais, EROs, espécies reativas de nitrogênio (ERNs) e produtos da peroxidação lipídica, principalmente o MDA ⁽⁸¹⁾ e, apesar de poucos estudos, 8-isoprostano ⁽⁹⁹⁾. Quanto aos níveis séricos de MDA, segundo alguns autores ⁽¹⁰⁰⁾, estudo em crianças menores de 10 anos de idade e recém-nascidos infectados pelo HIV mostrou maiores níveis nestes que em crianças saudáveis, apresentando correlação negativa com contagens de células T CD4+ ⁽¹⁰¹⁾. Em adultos infectados, há dados controversos sobre esse marcador. Enquanto, alguns autores ⁽¹⁰⁰⁾ mostraram não haver diferença entre infectados ou não pelo HIV e entre assintomáticos e sintomáticos, outros ^(81,90), encontraram concentrações elevadas de MDA naqueles infectados, com e sem sintomas.

Em sinergia com a infecção pelo HIV e o estresse oxidativo, a cARV, apesar de melhorar significativamente, os parâmetros clínicos, virais e imunológicos, também parece contribuir potencialmente com esse desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes ⁽⁹¹⁾, sendo

que, o aumento dos primeiros e a diminuição dos últimos, têm sido frequentemente associados em PVHA sob terapia⁽⁹³⁾ (figura 12).

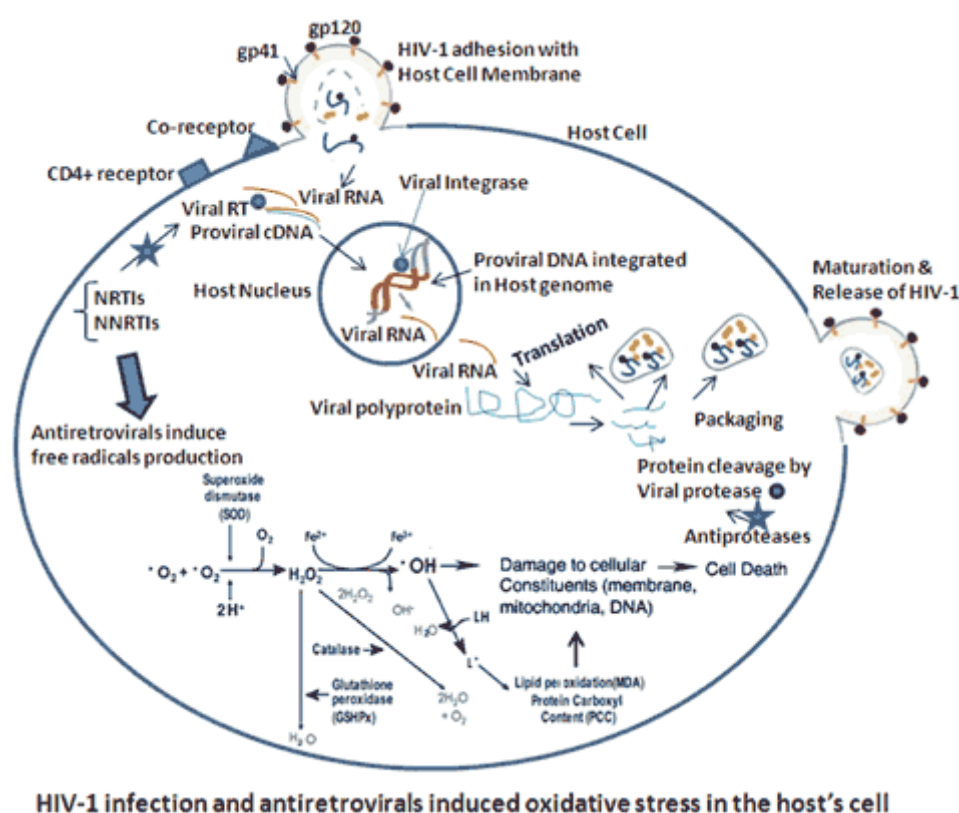


Figura 12. Infecção pelo HIV e antirretrovirais induzem o estresse oxidativo na célula do hospedeiro

Siglas: NRTIs, nucleotide reverse transcriptase inhibitors; NNRTIs, non-nucleotide reverse transcriptase inhibitors.

Fonte: Sharma B, 2014⁽⁷⁸⁾

A cART pode afetar a morfologia e função mitocondrial em alguns indivíduos⁽¹⁰²⁾ e aumentar quimicamente as espécies reativas na circulação, possivelmente pela maior produção de metabólitos oxidados, derivados da interação entre EROs e biomoléculas das células infectadas⁽⁹²⁾. No entanto, mecanismos específicos e cronologia destes eventos ainda permanecem incertos⁽¹⁰²⁾. Sabe-se que alguns ARV influenciam na toxicidade da mitocôndria e na ativação do sistema enzimático P450 do citocromo C, o que induz estresse oxidativo⁽⁹²⁾.

O tratamento também diminui a proteção antioxidante ou contribui com a falha em processos de reparo ao dano oxidativo⁽⁹¹⁾. Mandas *et al.*⁽⁹³⁾ observaram, inclusive, que número significativo de pacientes com ótima adesão à cART, tinham maior status oxidativo do que aqueles não aderentes, o que corrobora com as elevadas concentrações plasmáticas de

peroxidação lipídica, especialmente os F2-Isoprostanos, encontradas por Hulgán *et al.* ⁽⁹²⁾ e Redhage ⁽⁹⁹⁾ em PVHAs sob cART e com controle da replicação viral. Assim, este é um dos pontos que poderia ser incluído na abordagem sobre “início precoce ou tardio de cART”.

Alguns outros fatores desencadeados pelo uso da cART, tais como, dislipidemia, lipodistrofia e diarreia crônica estão relacionados ao aumento nos danos oxidativos ⁽⁹⁰⁾. Nesse sentido, anormalidades do metabolismo lipídico são comuns em PVHA e se relacionam com a resposta inflamatória presente, mediada por citocinas e que pode, por si só, ser pró-aterogênica ⁽¹⁰³⁾. Além disso, há cada vez maior evidência científica de que o estresse oxidativo também desencadeia relevantes implicações sobre os mecanismos que culminam com o desenvolvimento da síndrome metabólica ⁽¹⁰⁴⁾ e de várias comorbidades não associadas à aids, como a aterosclerose ⁽⁹⁹⁾. Sabe-se, inclusive, que a prevalência de doenças cardiovasculares é aumentada em pacientes infectados pelo HIV, em comparação com a população em geral ^(1,22) e, parece claro que, tanto a própria infecção quanto o uso de cART estão associados com maior risco de acidente vascular cerebral ⁽¹⁰⁵⁾.

A desordem neurocognitiva associada ao HIV é comum nos pacientes infectados e, achados de alguns estudos sugerem que a cART é uma das responsáveis pela indução de estresse oxidativo e neurotoxicidade ⁽¹⁰⁵⁾, pois, elevados níveis de oxidação proteica e lipídica são detectados no cérebro destes indivíduos ⁽¹⁰⁶⁾. Nesse sentido, autores sugerem que, devido ao acúmulo persistente de EROs nos neurônios na prolongada exposição aos antirretrovirais, ocorre estresse oxidativo local e a morte neural. Estudo experimental mostrou efeito genotóxico no cérebro de camundongos cronicamente tratados com Efavirenz que podem ser oriundos, em parte, do dano no DNA induzido pelo estresse oxidativo ⁽¹⁰⁷⁾. Assim, de acordo com Cagla *et al.* ⁽¹⁰⁶⁾, PVHA poderiam ser beneficiadas com terapias adjuvantes que incluíssem estratégias antioxidantes para superar os efeitos deletérios de cART.

Contudo, algumas das classes de cART são mais rapidamente associadas com efeitos adversos particulares e toxicidades. Por exemplo, os IP induzem o acúmulo de prelamina A, que causa instabilidade genômica e está diretamente relacionada ao aumento do estresse oxidativo e sintomas associados à lipodistrofia ⁽¹⁰⁸⁾. Além de alterarem o metabolismo lipídico ^(78,109), essas drogas desregulam as proteínas UPS (*ubiquitin-proteasome system*) que contribuem com estresse no retículo endoplasmático, bem como com o acúmulo de lipídeos e aparecimento da resistência à insulina, diabetes *mellitus* e aumento no risco de aterosclerose ⁽¹¹⁰⁾. Além disso, os IP ativam vias intracelulares de apoptose e aumentam o *status* pró-oxidante do ambiente intracelular ⁽¹¹⁰⁾.

Já os ITRN, inibem a transcriptase reversa, uma DNA polimerase dependente de RNA, agindo também na diminuição do DNA mitocondrial e danificando sua membrana e levando a menores taxas respiratórias e de fosforilação oxidativa, o que, consequentemente, induz maior produção de EROs e estresse oxidativo ⁽¹¹¹⁾. Quanto ao *status* antioxidante, um estudo brasileiro verificou concentrações deficientes de α -tocoferol foram encontradas em quase 20% dos pacientes estudados, dado mais frequente em regimes não compostos por ITRNN ⁽¹¹²⁾.

Estudos são, ainda, controversos quanto aos efeitos de ITRNN nos mecanismos de estresse oxidativo. Alguns mostraram maiores níveis de F2-isoprostanos em pacientes que recebiam Efavirenz ⁽⁹²⁾, sendo que, houve modesta associação entre colesterol total e F2-isoprostanos entre os indivíduos sem o ITRNN. Outros autores relataram que os níveis deste marcador aumentaram continuamente após 12 meses de terapia baseada em ITRNN, o que não ocorreu naqueles que receberam IP ⁽¹¹³⁾. Ao contrário, estudo de Redhage *et al.* ⁽⁹⁹⁾ mostrou que o uso de ITRNN, em particular da Nevirapina, mostrou discreta associação com menor estresse oxidativo, aferido pelo F2-isoprostanos plasmático, mesmo após ajuste com outras variáveis clínicas.

Na tentativa de se reduzir a incidência de estresse oxidativo e outras consequências da infecção pelo HIV e de cART, algumas pesquisas têm mostrado benefícios no uso de suplementação com antioxidantes e/ou micronutrientes ^(114,115) e que isso poderia, inclusive, ter impacto no desenvolvimento de outras doenças. Alguns exemplos são a administração de multivitaminas, exceto vitamina A, nos pacientes antes ou após início de cART ⁽¹¹⁵⁾ e a suplementação com magnésio, que mostrou evidência proteção contra disfunção de óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e estresse oxidativo endotelial mediado por Ritonavir *in vitro*, e diminuição da expressão de eNOS hepático *in vivo* ⁽¹¹⁶⁾, além da intervenção ter sido capaz de suprimir o estresse oxidativo sistêmico e inflamação cardíaca por Zidovudina em ratos ⁽¹¹⁷⁾.

- **Justificativa do Estudo**

Um dos atuais desafios na área de HIV/Aids é o melhor entendimento sobre a ativação imune persistente e a inflamação crônica que os infectados pelo vírus apresentam, mecanismos que refletem no envelhecimento precoce observado nesta população. Como efeito deste processo, esses indivíduos se deparam com outro grande desafio atualmente: o de postergar o aparecimento de comorbidades não associadas à aids, tais como distúrbios metabólicos, desenvolvimento de doenças cardiovasculares, comprometimento renal ou hepático, alterações ósseas, neoplasias, entre outros.

Apesar dos incontestáveis benefícios da cART ocorre diminuição apenas parcial dos níveis de ativação e inflamação em PVHA, mesmo nas que apresentam supressão viral adequada, quando comparadas aos indivíduos saudáveis, não infectados pelo HIV. Há de se considerar, também, os efeitos deletérios do uso prolongado de cART, sabendo-se que essas drogas induzem dislipidemia, aumento no estresse oxidativo e desequilíbrio de citocinas e podem contribuir com o desenvolvimento das comorbidades acima mencionadas.

Assim, a influência da terapia nos parâmetros de inflamação, ativação imune e estresse oxidativo devem ser melhor estudados, principalmente nos dias de hoje, com a indicação para início terapêutico cada vez mais precoce.

A participação de alguns parâmetros isolados nestes processos já é bem conhecida, como o envolvimento de MDA, isoprostanos, TAP, vitaminas, dano de DNA no estresse oxidativo e de AGE, sRAGE, HMGB1 e sCD14 e citocinas na ativação imune e inflamação. No entanto, são necessários mais estudos com estes marcadores, tanto na presença quanto na ausência de cART e em indivíduos que apresentam diferentes respostas imunológicas, ie, aqueles que possuem altos e baixos valores de T CD4+ apesar de controle da viremia, para viabilizar a aplicação destes componentes, em estudos de intervenção, modulação ou melhor monitoramento clínico dos pacientes.

Desta forma, estudar todos esses parâmetros em um único estudo, discutir a interação entre eles e a possível influência da cART nestes mecanismos seria uma abordagem inédita e poderia esclarecer lacunas e divergências observadas na literatura.

Objetivos

- **Objetivo Geral:**

Estudar marcadores de ativação imune, inflamação crônica e estresse oxidativo em PVHA assintomáticas e verificar possível influência dos antirretrovirais e contagens de linfócitos T CD4+ nesses parâmetros.

- **Objetivos Específicos:**

a) Estudar o perfil inflamatório e de ativação imune pela dosagem plasmática de HMGB1, AGE, sRAGE, sCD14 e citocinas (IL-6, IL-8 e IL-10);

b) Aferir o estresse oxidativo por meio da análise do sistema antioxidante (capacidade antioxidante total, vitaminas e seus precursores), pró-oxidante (MDA e 8-isoprostano) e do dano no DNA;

c) Analisar dosagens sanguíneas de glicose, triglicérides, colesterol total, PCR, linfócitos T CD4+ e carga viral do HIV.

Capítulo II



Capítulo II

Desenho do Estudo

• Sujeitos do Estudo

Foram incluídos pacientes adultos, com idade entre 20 e 50 anos, de ambos os sexos, infectados pelo HIV, que frequentam o Serviço de Ambulatórios Especializados em Infectologia “Domingos Alves Meira” (SAEI-DAM). O SAEI-DAM é centro de referência regional para atendimento da infecção pelo HIV/Aids na região de Botucatu, interior do Estado de São Paulo (*figura 13*). É também palco de ensino e pesquisa, que mantém vínculos com a Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) -UNESP e com o Hospital das Clínicas da FMB (HCFMB). Esse complexo é responsável pelo atendimento de 1,8 milhão de pessoas de 68 municípios do centro-oeste paulista. O Serviço do HCFMB atende pacientes infectados pelo HIV/Aids desde 1985, já tendo acumulado cerca de 3.000 pacientes. Atualmente, cerca de 600 PVHA estão em acompanhamento no Serviço.



Figura 13. Microrregião de Botucatu

Fonte: Sharma B, 2014 (78)

• Delineamento

Foram estudados 92 pacientes com infecção confirmada pelo HIV, atendidos no SAEI-DAM. O cálculo para o tamanho amostral (*tabela 1*) foi realizado com a ajuda do Escritório de Apoio à Pesquisa (EAP) da FMB–UNESP.

Tabela 1: Esquema de análise para cálculo do número amostral do estudo

CAUSA DE VARIAÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE
Grupos (G)	04
Resíduo	95
Total	99
Número Amostral	100
Estabelecimento G	(20 em cada um dos 5 grupos)

Desta forma, foi possível obter um alto valor para os graus de liberdade residual, o que certamente diminui a variabilidade.

Foram realizados dois tipos de estudo. A *figura 14* ilustra os grupos e características.

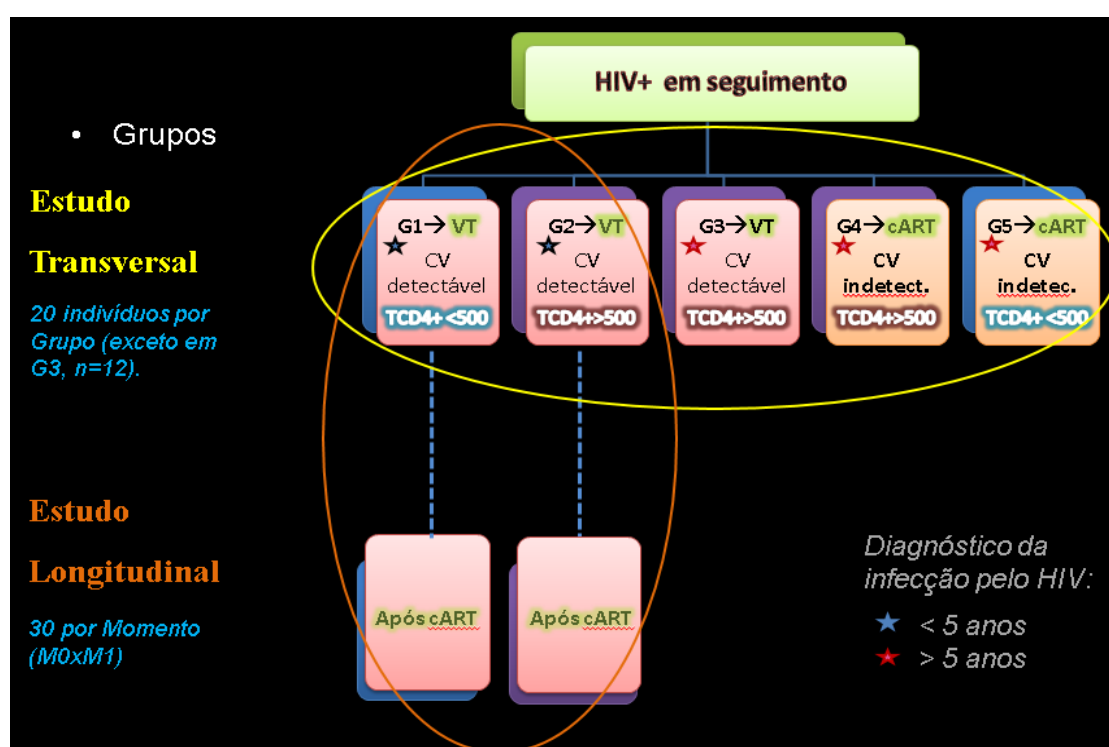


Figura 14: Delineamento do estudo e características específicas dos grupos infectados pelo HIV

VT: virgens de tratamento; cART: terapia antirretroviral combinada; CV: carga viral; M0: pré-cART; M1: pós-cART.

→ O “ESTUDO TRANSVERSAL” teve caráter observacional prospectivo (sem intervenção), envolveu 100 pacientes que foram distribuídos em cinco grupos.

- **Grupo 1:** indivíduos com diagnóstico de infecção por HIV há menos de cinco anos, virgens de cART e contagens de T CD4+ inferiores a 500 células/mm³;
- **Grupo 2:** indivíduos diagnosticados há menos de cinco anos, virgens de cART e contagens de T CD4+ superiores a 500 células/mm³;
- **Grupo 3:** indivíduos diagnosticados há mais de cinco anos, virgens de cART e com contagens de T CD4+ superiores a 500 células/mm³ desde o diagnóstico da infecção;
- **Grupo 4:** PVHA que estão sob cART eficaz e resposta imunológica adequada há pelo menos cinco anos (ou seja, com histórico de supressão viral e contagens T CD4+ maiores que 500 células/mm³ durante todo este período);
- **Grupo 5:** PVHA sob cART eficaz e resposta imunológica inadequada há pelo menos cinco anos (ou seja, com histórico de supressão viral adequada mas que não restabeleceram, ainda, as contagens de T CD4+ para níveis basais/normais e apresentam contagens de T CD4+ inferiores a 500 células/mm³, durante todo este período).

→ No “ESTUDO LONGITUDINAL”, a intervenção considerada foi o início da terapia antirretroviral. A pesquisa envolveu 30 indivíduos, a princípio virgens de tratamento (os mesmos pacientes do estudo transversal) sendo que, a análise dos marcadores foi realizada em dois momentos:

- **Momento 0 (M0):** antes do início da cART e;
- **Momento 1 (M1):** cerca de seis a 12 meses após início de cART.

- **Marcadores e técnicas**

À partir das amostras de sangue colhidas em tubos com EDTA, foram estudados 12 marcadores, além daqueles obtidos através dos prontuários médicos (T CD4+, CV, glicose, triglicérides, colesterol total e proteína C reativa), conforme mostra a *figura 15*.

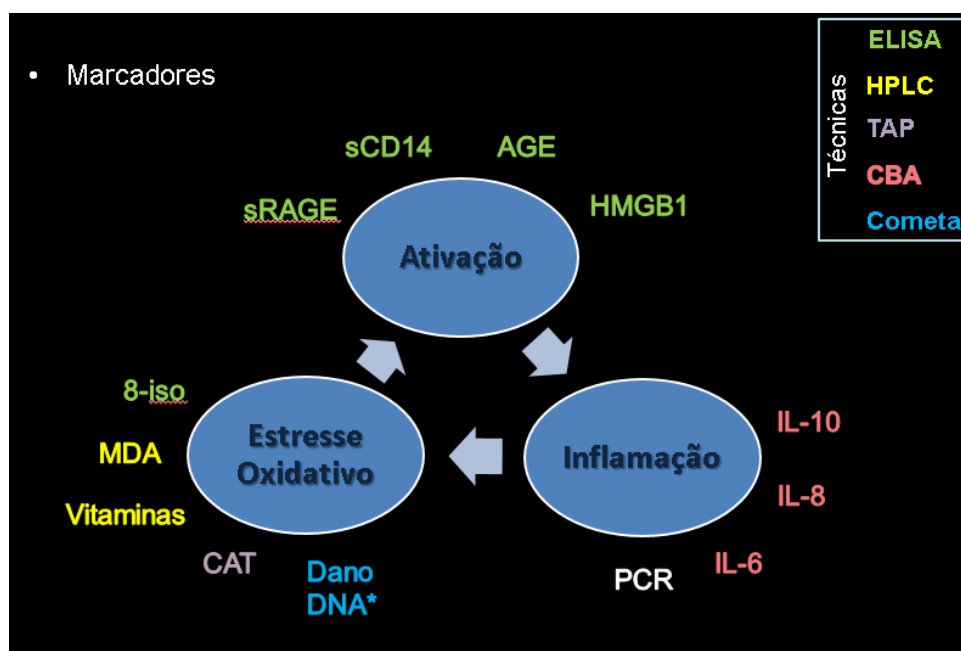


Figura 15: Marcadores escolhidos para o estudo de estresse oxidativo, inflamação e ativação imune em PVHA, e metodologia utilizada

PVHA: pessoas que vivem com HIV/aids; AGEs: produtos finais de glicação avançada; sRAGE: receptores de AGEs; HMGB1: high mobility group box protein-1; sCD14: CD14 solúvel; IL: interleucinas; PCR: proteína C-reativa (resultados fornecidos pelos prontuários eletrônicos); CAT: capacidade antioxidante total; MDA: malondialdeídos; 8-iso: 8-isoprostano; ELISA: ensaio imunoenzimático; HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência; TAP: total antioxidante performance; CBA: cytometric bead array. * técnica desenvolvida à partir de células mononucleares do sangue periférico (nas demais técnicas, utilizou-se o plasma dos sujeitos do estudo).

Referências*

*Segundo normas de Vancouver: “Uniform Requeriments for Manuscripts to Biomedical Journal” (International Comitte of Medical Journal Editors, 2008. <http://www.icmje.org>)

1. **Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS).** *Global report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic.* s.l. : Disponível em: http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2012/gr2012/20121120_UNAIDS_Global_Report_2012_en.pdf, 2012.
2. **(WHO), World Health Organization.** *The top 10 causes of death. Fact sheet n°310.* 2014.
3. **Brasil, Ministério da Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais.** *BOLETIM EPIDEMIOLOGIA DST AIDS.* (1) 2014. Ano III.
4. **Coordenação do Programa Estadual de DST/Aids de São Paulo Centro de Referência e Treinamento em DST/Aids – CRT-DST / AIDS-SP , Centro de Vigilância Epidemiológica “Alexandre Vranjac”, Coordenadoria de Controle de Doenças, Secretaria de Estado da Saúde de.** *Boletim Epidemiológico de DST/Aids.* (1) 2014.
5. **Okulicz JF, Marconi VC, Landrum ML, Wegner S, Weintrob A, Ganesan A, et al.** Clinical outcomes of elite controllers, viremic controllers, and long-term nonprogressors in the US Department of Defense HIV Natural History Study. *J Infect Dis.* 2009, 200(11):1.
6. **Fellay JK, Shianna V, Telenti A, Golstein DB.** Host genetics and HIV-1: the final phase? *PLoS Pathog.* 2010, 6(10):1001-33.
7. **Poropatich K, Sullivan DJ Jr.** Human immunodeficiency virus type 1 long-term non-progressors: the viral, genetic and immunological basis for disease non-progression. *J Gen Virol.* 2011, 92:247-68.
8. **Pantaleo G, Graziosi C, Butini L, Pizzo PA, Schnittman SN, Kloter DP, et al.** Lymphoid organs function as major reservoirs for human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991, 88(21):9838-42.
9. **Alexaki A, Liu Y, Wigdahl B.** Curr HIV Res. *Cellular reservoirs of HIV-1 and their role in viral persistence.* 2008, 6(5):388-400.
10. **Ribeiro FA, Tupinambás U, Fonseca MO, Greco DB.** Durability of the first combined antiretroviral regimen in patients with AIDS at a reference center in Belo Horizonte, Brazil, from 1996 to 2005. *Braz J Infect Dis.* 2012, 16(1):27-33.
11. **Sáez-Cirión A, Bacchus C, Hocqueloux L, Avettand-Fenoel V, Girault I, et al.** Post-Treatment HIV-1 Controllers with a Long-Term Virological Remission after the Interruption of Early Initiated Antiretroviral Therapy ANRS VISCONTI Study. *PLoS Pathog.* 2013, 9(3):e1003211.

12. **Emery S, Neuhaus JA, Phillips AN, Babiker A, Cohen CJ, Gatell JM.** Major clinical outcomes in antiretroviral therapy (ART)-naïve participants and in those not receiving ART at baseline in the SMART study. *J Infect Dis.* 2008, 197(8):1133-44.
13. **Benveniste O, Flahault A, Rollet F, et al.** Mechanisms involved in the low-level regeneration of CD4⁺ cells in HIV-1-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy who have prolonged undetectable plasma viral loads. *J Infect Dis.* 2005, 191(10):1670-79.
14. **Brasil, Ministério da Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais.** *Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV/aids em Adultos.* 2013.
15. **Cohen MS, Chen YQ, McCauley M, Gamble T, Hosseinipour MC, et al.** Prevention of HIV-1 Infection with Early Antiretroviral Therapy. *N Engl J Med.* 2011, 365:493–505.
16. **Ostrowski SR, Katzenstein TL, Thim PT, Petdersen BK, Gerstoft J, Ullum H.** Low-level viremia and proviral DNA impede immune reconstitution in HIV-1 infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis.* 191(3):348-57.
17. **Marchetti G., Bellistri GM., Borghi E, et al.** Microbial translocation is associated with sustained failure in CD4⁺T-cell reconstitution in HIV-infected patients on long-term highly active antiretroviral therapy. *AIDS.* 2008, 22(15):2035-38.
18. **Engsig FN, Gerstoft J, Kronborg G, et al.** Long-term mortality in HIV patients virally suppressed for more than three years with incomplete CD4 recovery: a cohort study,” *BMC Infectious Diseases.* 2010, 318.
19. **CS, Rodrigues.** Interrupção do acompanhamento clínico ambulatorial de pacientes infectados pelo HIV. *Rev Saúde Pública.* 2003, 37:183-90.
20. **Fidler S, Fox J, Porter K, Weber J.** Primary HIV infection: to treat or not to treat? *Curr Opin Infect Dis.* 2008, 21:4-10.
21. **Pereira CCA, MachadoCJ, Rodrigues RN.** Perfis de causas múltiplas de morte relacionadas aoHIV/AIDS nos municípios de São Paulo e Santos, Brasil, 2001. *Cad. Saúde Pública.* 2007, 23(3):645-55.
22. **Guaraldi G, Orlando G, Zona S, et al.** Premature age-related comorbidities among HIV-infected persons compared with the general population. *Clin Infect Dis.* 2011, 53:1120–6.
23. **KV, Ramana.** Effect of Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART) on Human Immunodeficiency Virus Disease Pathogenesis and Progression. *American Journal of Public Health Research.* 2014, 2(3):68-74.
24. **Ngala RA, Opoku D, Asare G.** Effects of HIV Infection and Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART) on the Liver of HIV Patients. *Trends Med. Res.* 2015, 10(1):1-11.
25. **Crum-Cianflone N, et al.** Prevalence and Factors Associated with Renal Dysfunction Among HIV Infected Patients. *AIDS Patient Care STDS.* 2010, 24:353.

26. **S, Deeks.** HIV Infection, Inflammation, Immuno-senescence, and Aging. *Ann Rev Med.* 2011, 62:141.
27. **K, Venkataramana.** A study of biological markers in HIV disease progression and management in the highly active antiretroviral therapy (HAART) era. *American Journal of Bioscience and Bioengineering.* 2013, 1(2):24-37.
28. **Schouten J, Wit FW, Stolte IG, et al.** Comorbidity and ageing in HIV-1 infection: the ageHIV Cohort Study. *Abstract THAB0205). Paper presented at: 19th International AIDS Conference; 2012. July 22–27; Washington, D.C..*
29. **Hsu DC, Sereti I, Ananworanich J.** Serious Non-AIDS events: Immunopathogenesis and interventional strategies. *AIDS Research and Therapy.* 2013, 10:29 .
30. **PW, Hunt.** HIV and Inflammation: Mechanisms and Consequences. *Current HIV/AIDS Reports.* 2012, 9(2):139-47.
31. **Orsilles MA, Pieri E, Cooke P, Caula C.** IL-2 and IL-10 serum levels in HIV-1-infected patients with or without active antiretroviral therapy. *APMIS.* 2006, 114:55-60.
32. **Heise C, Miller CJ, Lackner A, Dandekar S.** Primary acute simian immunodeficiency virus infection of intestinal lymphoid tissue is associated with gastrointestinal dysfunction. *J Infect Dis.* 1994, 169:1116-20.
33. **Nigam P, Kwa S, Velu V, Amara RR.** Loss of IL-17–Producing CD8 T Cells during Late Chronic Stage of Pathogenic Simian Immunodeficiency Virus Infection. *The Journal of Immunology.* 2010.
34. **Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, et al.** Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med.* 2006, 12(12):1365-71.
35. **Hunt PW, Martin JN, Sinclair E, Bredt B, Hagos E, Lampiris H, et al.** T Cell Activation Is Associated with Lower CD4+ T Cell Gains in Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients with Sustained Viral Suppression during Antiretroviral Therapy. *J Infect D.* 2013, 187(10):1534-43.
36. **Appay V, Sauce D.** Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. *J Pathol.* 2008, 214:231–41.
37. **Kottlilil S, Gamberg J, Bowmer I, Trahey J, Howley C, Gallant M, et al.** Human immunodeficiency virus type 1 replication, immune activation, and circulating cytotoxic T cells against uninfected CD4+ T cells. *J Clin Immunol.* 2000, 20(3):175-86.
38. **Champagne, P., et al.** Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes. *Nature.* 2001, 410:106–11.
39. **D’Souza WN, Chang CF, Fischer AM, Li M, Hedrick SM.** The Erk2 MAPK regulates CD8 T cell proliferation and survival. *J. Immunol.* 2008, 181:7617–29.

40. **Zybarth G, Reiling N, Schmidtayerova H, Sherry B, Bukrinsky M.** Activation-induced resistance of human macrophages to HIV-1 infection in vitro. *J Immunol.* 1999, 162:400–6.
41. **Hudson BI, Holfmann AM, Bucciarelli L, Wendt T, Moser B, LU Y, et al.** Glycation and diabetes: The RAGE connection. *Diabetes.* 2002, 83(12).
42. **Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM.** The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J. Clin. Invest.* 2001, 108:949-55.
43. **Huebschmann AG, Regensteiner JG, Vlassara H, Reusch JE.** Diabetes and advanced glycoxidation end products. *Diabetes Care.* 2006, 29:1420-32.
44. **Srikanth V, Maczurek A, Phan T, Steele M, Westcott B, et al.** Advanced glycation endproducts and their receptor RAGE in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2009.
45. **Liliensiek B, Weigand MA, Bierhaus A, Nicklas W, Kasper M, et al.** Receptor for advanced glycation end products (RAGE) regulates sepsis but not the adaptive immune response. *J. Clin. Invest.* 2004, 113:1641-50.
46. **Su JinJeonga, ChangOhKima, YoungGooSonga, Ji-hyeonBaeka, et al.** Low plasma levels of the soluble receptor for advanced glycation end products in HIV-infected patients with subclinical carotid atherosclerosis receiving combined antiretroviral therapy. *Atherosclerosis.* 2011, 219:778-83.
47. **Sims GP, Rowe DC, Rietdijk ST, Herbst R, Coyle AJ.** HMGB1 and RAGE in Inflammation and cancer. *Annu. Rev. Immunol.* 2010, 28:367–88.
48. **Kalea AZ, Schimidt AM, Hudson BI.** RAGE: a novel biological and genetic marker for vascular disease. *Clinical Science.* 2009, 116:621–37.
49. **Zhang S, Zhong J, Yang P, Gong F, Wang CY.** HMGB1, an innate alarmin, in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Int J Clin Exp Pathol.* 2009, 3(1):24-38.
50. **Wang H, Bloom O, Zhang M, et al.** HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science.* 1999, 285(5425):248-51.
51. **Ulloa L, Messmer D.** High-mobility group box 1 (HMGB1) protein: friend and foe. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006, 17(3):189-201.
52. **Trøseid M, Sönnernborg A, Nowak P.** High Mobility Group Box Protein-1 in HIV-1 Infection: Connecting Microbial Translocation, Cell Death and Immune Activation. *Current HIV Research.* 2011, 9:6-10.
53. **Nowak P, Barqasho B, Sonnerborg A.** Elevated plasma levels of high mobility group box protein 1 in patients with HIV-1 infection. *AIDS.* 2007, 21(7):869-71.
54. **Youn JH, Oh YJ, Kim ES, Choi JE, Shin JS.** High mobility group box 1 protein binding to lipopolysaccharide facilitates transfer of lipopolysaccharide to CD14 and enhances lipopolysaccharide-mediated TNF-alpha production in human monocytes. *J Immunol.* 180(7):5067-74.

55. **Thierry S, Gozlan J, Jaulmes A, et al.** High-mobility group box 1 protein induces HIV-1 expression from persistently infected cells. *AIDS*. 2007, 21(3):283-92.
56. **Said EA, Dupuy FP, Trautmann L, et al.** Programmed death-1-induced interleukin-10 production by monocytes impairs CD4⁺ T cell activation during HIV infection. *Nat Med*. 2010, 16(4):452–9.
57. **Sachdeva RK, Wanchu A, Bagga R, Malla N, Sharma M.** Effect of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors on cytokine, chemokine, and immunoglobulin profiles in serum and genital secretions of HIV-infected women. *J Interferon & Cytokine Res*. 2010, 30:29.
58. **Clerici M, Shearer GM.** The Th1-Th2 hypothesis of HIV infection: new insights. *Immunol Today*. 1994, 15(12):575-81.
59. **Neuhaus J, Jacobs DR Jr, Baker JV et al.** Markers of inflammation, coagulation, and renal function are elevated in adults with HIV infection. *J Infect Dis*. 2010, 201:788–95.
60. **Anthony IC, et al.** Accelerated Tau deposition in the brains of individuals infected with human immunodeficiency virus-1 before and after the advent of highly active anti-retroviral therapy. *Acta Neuropathol*. 2006, 111:529-38.
61. **Brugnaro P, Morelli E, Cattelan F, Petrucci A, Panese S, Esemé F, et al.** Non-acquired immunodeficiency syndrome defining malignancies among human immunodeficiency virus-positive subjects: Epidemiology and outcome after two decades of HAART era. *World J Virol*. 2015, 4(3):209-18.
62. **Nunnari G, Smith JA, Daniel R.** HIV-1 Tat and AIDS-associated cancer: targeting the cellular anti-cancer barrier? *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2008, 27.
63. **Dauby N, Wit SD, Delforge M, Necsoi VC, Clumeck N.** Characteristics of non-AIDS-defining malignancies in the HAART era: a clinico-epidemiological study. *Journal of the International AIDS Society*. 2011, 14.
64. **French MA, King MS, Tschampa JM, da Silva BA, Landay AL.** Serum immune activation markers are persistently increased in patients with HIV infection after 6 years of antiretroviral therapy despite suppression of viral replication and reconstitution of CD4⁺ T cells. *J Infect Dis*. 2009, 200(8):1212-15.
65. **Aberg.** Aging, Inflammation, and HIV. *Top Antiviral Med*. 2012, 20(3):101-5.
66. **Young J, Weber R, Rickenbach M, et al.** Lipid profiles for antiretroviral-naïve patients starting PI- and NNRTI-based therapy in the Swiss HIV Cohort Study. *Antiv Ther*. 2005, 10:585-91.
67. **Ross AC, Armentrout R, O’Riordan MA, et al.** Endothelial Activation Markers Are Linked to HIV Status and Are Independent of Antiretroviral Therapy and Lipodystrophy. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2008, 49(5):499-506.

68. **Mgogwe J, Semvua H, Msangi R, Mataro C, Kajeguka D, Chilongola J.** The evolution of haematological and biochemical indices in HIV patients during a six-month treatment period. *African Health Sciences* . 2012, 12(01).
69. **Evans D, Maskew M, Sanne I.** Increased risk of mortality and loss to follow-up among HIV-positive patients with oropharyngeal candidiasis and malnutrition prior to ART initiation – A retrospective analysis from a large urban cohort in Johannesburg, South Africa. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2012, 113(3):362–72.
70. **Rose H, Woolley I, Hoy J, Dart A, Bryant B, Mijch A, Sviridov D.** HIV infection and high-density lipoprotein: the effect of the disease vs the effect of treatment. *Metabolism*. 2006, 90-5.
71. **Bauer ME, De la Fuente M.** The role of oxidative and inflammatory stress and persistent viral infections in immunosenescence. *Mechanisms of Ageing and Development*. (2016). In Press.
72. **Lazzarotto A, Reichert MT, Venker C, Kramer AS, Sprinz E.** HIV/aids e meia idade: avaliação do conhecimento de indivíduos da região do Vale do Sinos (RS). *Brasil. Ciênc. saúde coletiva*. 2010, 15(Supl 1):1185-90.
73. **DP, Jones.** Redefining oxidative stress. *Antioxid.Redox Signal*. 2006, 8:1865-79. .
74. **Jacob K, et al.** Markers of oxidant stress that are clinically relevant in aging and age-related disease. *Mech Ageing Dev*. 2013, 134:139-57.
75. **Kohen R, Nyska A.** Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol*. 2002, 30:620-50.
76. **Halliwell B, Whiteman M.** Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*. 2004, 142:231-55.
77. **Barbosa KBF, et al.** Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. *Rev. Nutr., Campinas*. 2010, 23(4):629-43.
78. **B, Sharma.** Oxidative Stress in HIV Patients Receiving Antiretroviral Therapy. *Current HIV Research*. 2014, 12:13-21.
79. **ST, Mayne.** Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *J. Nutr*. 2003, 133(Suppl 3):933S-940S.
80. **Reyes, et al.** Disfunción endotelial y estrés oxidativo. *Rev. Endocrinol. Nutr*. 2006, 14(4):233-36.
81. **González BI, et al.** Oxidant/antioxidant status in subjects with HIV infection in different clinical conditions. *Biomedicine & Aging Pathology*. 2014, 4:235-42.
82. **Beretta G, et al.** Total antioxidant performance: a validated fluorescence assay for the measurement of plasma oxidizability. *Anal Biochem*. 2006, 354:290-8.

83. **PY, Niizu.** Universidade Estadual de Campinas. Campinas, Brasil : s.n., 2003. Dissertação do Mestrado.
84. **Kiokias S, Oreopoulou V.** Antioxidant properties of natural carotenoid extracts against the AAPH-initiated oxidation of food emulsions. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2006, 7:132-39.
85. **Kadiiska MB, et al.** *Free Radical Biol Med*. 2005, 38:698.
86. **Richelle M, et al.** Urinary isoprostane excretion is not confounded by the lipid content of the diet. *FEBS Lett*. 1999, 459:259-62.
87. **Lima ES, Abdalla DSP.** Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Rev Bras Ciências Farm*. 2001, 37(3).
88. **Martin JA, et al.** Hepatic γ -cystathionase deficiency in patients with AIDS. *Jou of the Am Med Associat*. 2001, 285(11):1444-45.
89. **Delmas-Beauvieux MC, et al.** The enzymatic anti-oxidant system in blood and glutathione status in HIV-infected patients: effects of supplementation with sele-nium or b-carotene. *Am J Clin Nutr*. 1996, 64(1):101-7.
90. **Suresh DR, et al.** Research- Total antioxidant capacity – a novel early bio-chemical marker of oxidative stress in HIV infected individuals. *Journal of Biomedical Science*. 2009, Vol. 16(61):, p. 1423.
91. **Ngondi JL, et al.** The effect of different combination therapies on oxidative stress markers in HIV infected patients in Cameroon. *AIDS Res Ther*. 2006, 3:19.
92. **Hulgan T, et al.** Oxidant stress is increased during treatment of human immunodeficiency virus infection. *Clin Infect Dis*. 2003, 37(12):1711-17.
93. **Mandas A, et al.** Oxidative Imbalance in HIV-1 Infected Patients Treated with Antiretroviral Therapy. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2009, 749575-7.
94. **Iris Benzie FF, Strain JJ.** The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Analytical Biochem*. 1996, 239:70-76.
95. **Drain PK, et al.** Micronutrients in HIV-positive persons receiving highly active antiretroviral therapy. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2007, 85(2):333-45.
96. **Leonore A. Herzenberg, et al.** Glutathione deficiency is associated with impaired survival in HIV disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997, 94:1967-72.
97. **Bilbis LS, et al.** Serum levels of antioxidant vitamins and mineral elements of human immunodeficiency virus positive subjects in Sokoto, Nigeria. *Ann Afr Med* 2010. 9(4):235-39.

98. **Semba RD, Graham NM, Caiaffa WT, Margolick JB, Clement L, Vlahov D.** Increased mortality associated with vitamin A deficiency during human immunodeficiency virus type 1 infection. *Arch Intern Med.* 1993, 153(18):2149-54.
99. **Redhage LA, et al.** Clinical Factors Associated with Plasma F2-Isoprostane Levels in HIV-Infected Adults. *HIV ClinTrials.* 2009, 10(3):181-192.
100. **Jareno EJ, et al.** Serum malondialdehyde in HIV seropositive children. *Free Radic Biol Med.* 1998, 24:503-6.
101. **Kovacs JA, Lempicki RA, Sidorov IA, et al.** Identification of dynamically distinct subpopulations of T lymphocytes that are differentially affected by HIV. *J Exp Med.* 2001, 194:1731-41.
102. **Smith RL, Boer R, Stanley B.** Premature and accelerated aging: HIV or HAART? *Frontiers in Genetics - Genetics of Aging.* 2013, 3:328.
103. **Miro O, et al.** Mitochondrial effects of HIV infection on the peripheral blood mononuclear cells of HIV-infected patients who were never treated with antiretrovirals. *Clin Infect Dis.* 2004, 39:710-6.
104. **Furukawa S, et al.** Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 2004, 114(12):1752-61.
105. **Mielke MM, et al.** Disturbance in cerebral spinal fluid sphingolipid content is associated with memory impairment in subjects infected with the HIV. *J Neurovirol.* 2010, 16:445-56.
106. **Cagla A, et al.** Antiretroviral drugs induce oxidative stress and neuronal damage in the central nervous system. *J. Neurovirol.* 2014, 20:39-53.
107. **Oliveira HM, Damiani AP, Dias RO, Romão PRT, Andrade VM.** Effect of antiretroviral drugs on the DNA damage in mice. *Environmental toxicology and pharmacology.* 2004, 37:390-95.
108. **Reddy S, Comai L, Lamin A.** Lamin A, farnesylation and aging. *Exp Cell Res.* 2012, 318:1-7.
109. **Touzet O, Philips A.** Resveratrol protects against protease inhibitor induced reactive oxygen species production, reticulum stress and lipid raft perturbation. *AIDS.* 2012, 24:1437-47.
110. **Kathleen MSE, Reyskens M, FaadielEssop.** HIV protease inhibitors and onset of cardiovascular diseases: A central role for oxidative stress and desregulation of the ubiquitin–proteasome system. *Biochimicaet Biophysica Acta.* 2014, 1842:256-68.
111. **Nolan D, Mallal S.** Complications associated with NRTI therapy: update on clinical features and possible pathogenic mechanisms. *Antivir Ther.* 2004, 9:849-63.
112. **Kaio DJI, Rondó PHC, Lu LA et al.** Vitamin E Concentrations in Adults with HIV/AIDS on Highly Active Antiretroviral Therapy. *Nutrients.* 2014, 6:3641-52.
113. **Gupta SK, et al.** Worsening Endothelial Function with Efavirenz Compared to Protease Inhibitors: A 12-Month Prospective Study. *PLoS ONE.* 2012, 7(9):45716.

114. **Akiibinu M, Adeshiyan AA, Olalekan AO.** Micronutrients and markers of oxidative stress in symptomatic HIV-positive/aids vigerians: a call for adjuvant micronutrient therapy. *IIOABJ*. 2012, 3:7-11.
115. **Tang AM, et al.** Micronutrients: current issues for HIV care providers. *AIDS*. 2005, 19:847-61.
116. **Chen X, Makn IT.** Mg supplementation protects against ritonavir-mediated endothelial oxidative stress and hepatic eNOSdownregulation. *Free Radical Biologyand Medicine*. 2014, 69:77-85.
117. **Mak IT, et al.** AZT-induced oxidative cardiovascular toxicity: attenuation by Mg-supplementation. *Cardiovasc Toxicol*. 2009, 9:78–85.

Capítulo III



Capítulo III

Artigos Científicos

Artigo nº 1: The initial months of antiretroviral therapy and its influence on AGEs, HMGB1 and sRAGE levels in asymptomatic HIV-infected individuals.

Artigo nº 2: Antiretroviral therapy initiation alters the redox system of asymptomatic HIV-infected individuals.

Artigo nº 3: Ativação Imune e Estresse Oxidativo em Indivíduos com Infecção Assintomática pelo HIV

The initial months of antiretroviral therapy and its influence on AGEs, HMGB1 and sRAGE levels in asymptomatic HIV-infected individuals.

Karen Ingrid Tasca^{1§}, Juliana Caleffi Trindade¹, Camila Renata Correa², Mariana Gatto¹, Caio Cavassan de Camargo¹, Monica Bannwart Mendes¹, Marjorie de Assis Golim³, Mara Biasin⁴ and Lenice do Rosário de Souza¹.

¹ *Department of Tropical Diseases, Botucatu Medical School (FMB), Univ Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, Brazil.*

² *Department of Pathology, FMB/UNESP, Botucatu, Brazil.*

³ *Hemocenter, FMB/UNESP, Botucatu Brazil.*

⁴ *Department of Biomedical and Clinical Sciences, University of Milan, Milan, Italy.*

Keywords: HIV/AIDS, cART, Inflammation, AGEs, sRAGE, HMGB1, CRP, Cytokines

Abstract

Introduction: Analyzing the current causes of deaths of people living with HIV/AIDS (PLWHA), it turns out that, unlike the pre-cART era (combination antiretroviral therapy), the highlights are typical manifestations of aging, such as dyslipidemia, cardiovascular disease and diabetes *mellitus*. The primary development of these diseases can be partially ascribed to the persistent immune activation and chronic inflammation characterizing these individuals. The aim of this study was to analyze the effect exerted by cART administration on plasma levels of HMGB1 (high mobility group box protein-1), AGEs (advanced glycation end-products), their soluble receptor sRAGE, cytokines and C-reactive protein (CRP) in PLWHA.

Methods: Analyses were performed longitudinally on 30 asymptomatic PLWHA, before and about six to twelve months after the introduction of cART. The plasma measurements of sRAGE, and AGEs HMGB1 were performed by enzyme immunoassay (ELISA) while cytokine plasma levels were analyzed by CBA (cytometric bead array). Clinical data were collected from medical records.

Results: Analysis in the pre and post-cART differ only in AGEs (0.64 ± 0.12 vs 0.49 ± 0.10 $\mu\text{g/mL}$, $p < 0.001$), CRP (0.74 ± 0.41 vs 1.06 ± 0.99 mg/dL , $p = 0.006$) and triglycerides levels (142.90 ± 53.38 vs 184.90 ± 115.07 mg/dL , $p = 0.001$). There was a positive correlation between IL-10 with IL-8, IL-6 and CRP and between sRAGE and HMGB1; negative correlation was observed between CD4⁺ T cell counts and both IL-6 and IL-8 cytokines.

Conclusion: lower levels of AGEs post-cART were accompanied by an increase of CRP and triglyceride levels already in the early months of therapy. Because of the current ever-earlier recommendations to start cART and its prolonged use, these and other markers should be investigated in order to monitor and postpone the appearance of non-AIDS comorbidities in HIV-infected people.

Introduction

Although the HIV epidemics affects more than 36 million individuals worldwide, with a global prevalence of almost 1% [1], life expectancy of people living with HIV/AIDS (PLWHA) is very similar to that of the general uninfected population, which makes the clinical approach to the infection similar to that of other chronic diseases that characterize aging [1-3]. This improvement is due to the combination of several actions and advances in this area, especially the guaranteed access to potent and combined antiretroviral therapy (cART) to the majority of the population [1,2,4].

However, the great challenge today is to delay the onset and severity of non-AIDS-defining comorbidities, which appear much earlier in HIV-infected individuals [5] and include cardiovascular diseases, diabetes *mellitus*, kidney, liver and bone alterations and neoplasias [4-8]. The onset and severity of these comorbidities are strictly dependent on the intense immune activation and chronic inflammation affecting PLWHA, regardless cART administration, which can only partly reduce these conditions and the derived products [3,7]. Furthermore, the toxicity and adverse effects of cART can also foster the development of such diseases [7,9], mainly dyslipidemia.

Advanced glycation end-products (AGEs), are a consequence of oxidative stress which occur during normal physiological conditions such as aging. However if they are not excreted in the urine or their formation is exacerbated as in the case of diabetes hyperglycemia and other diseases, they accumulate in the vascular tissue, causing harmful effects [10]. Furthermore their binding to their receptors (RAGE), promotes the activation of proinflammatory and procoagulant cellular pathways, thus increasing the production of adhesion molecules, cytokines such as IL-6 and TNF- α and the generation of nitric oxide (NO). These mechanisms can influence the course of HIV-infection and contribute to a number of serious pathological conditions, including the development of atherosclerosis, diabetes *mellitus*, osteoporosis, neurological disorders, among others [11-16].

It has also been observed that, an alternative mRNA splicing which removes RAGE transmembrane domain [17,18] results in the production of a soluble RAGE (sRAGE) [19]. sRAGE competes with the transmembrane receptor sequestering its ligands and preventing the activation of proinflammatory pathways [18]. Therefore, decreased sRAGE levels have been associated with increased cardiovascular risk [20], hypercholesterolemia [21], high blood pressure [22], as well as diabetes *mellitus* [23], and new drugs prompting RAGE blocking and/or sRAGE increase have been proposed for future therapies [17].

High mobility group box protein-1 (HMGB1) is another key factor in promoting inflammation. It can be actively secreted following different stimuli, such cytokines, endotoxins, and pathogen-associated molecular patterns (PAMPS) [24] or passively, by necrotic cells [25], common conditions observed in HIV-individuals. In the extracellular environment, HMGB1 activates various pattern-recognition receptors (PRRs), such as RAGE and toll-like receptors (TLR) [26-28] and acts as a proinflammatory cytokine [25] and alarmin, stimulating both innate and adaptive immune system to prevent damage and promoting regeneration and repair [29]. In humans, its high systemic levels are related to several acute and chronic inflammatory conditions, including pancreatitis, diabetes *mellitus*, rheumatologic and autoimmune diseases and cancer [16,28,30-32].

Few studies have investigated the role of these markers in HIV infection and how their expression is altered following cART initiation. Considering the need for better understanding of inflammatory mechanisms and cellular activation in this patients, as well as their influence on the “premature aging” phenomenon, the aim of this study was to compare the levels of HMGB1, AGEs and sRAGE in the plasma of asymptomatic PLWHA pre-cART and approximately six months to one year after its introduction.

Methods

Study design:

This is a longitudinal study involving 30 HIV-infected subjects, attended at the Specialist Outpatient Service for Infectious Diseases "Domingos Alves Meira" (SAEI-DM), at the Botucatu Medical School Complex (FMB)-UNESP, in São Paulo state, Brazil. This Service covers about 600 people from Botucatu city and surrounding area and, for this study, were interviewed 150 people, being included only 30 of them after applying the exclusion criteria. The collection of data and biological samples was carried out in two stages, before therapy initiation (M0) and approximately six to twelve months after this intervention (M1). This research project was approved by the local Research Ethics Committee, and was conducted between the years 2012 and 2015.

Inclusion and exclusion criteria:

The inclusion criteria were: age comprised between 20 and 50 years old, no previous cART administration, signing an Informed Consent Form.

Patients excluded were those with any of the following conditions: use of vitamin supplements, cancer history (current or previous), anorexia, morbid obesity, diabetes *mellitus*, cardiovascular, genetic or autoimmune diseases, organ transplants, pregnancy at any stage or breastfeeding, co-infections such as tuberculosis, chronic viral hepatitis, cerebral or disseminated toxoplasmosis, use of illicit drugs and alcohol. For the following criteria, exclusion occurred when patients concomitantly reported two of them or more: regular performance of intense physical exercise; use of antibiotics, anxiolytics or antidepressants; active smoking. People with only one of these conditions were included because the statistical analysis was conducted in adjusted models for these variables.

Socio-demographic and clinical data:

Socio-demographic and clinical data were collected by interviews and from the patients' medical records. Most of the participants were males (60.0%) aged approximately 34 years (± 8.2), heterosexual (66.6%) and single (36.6%). The mean duration of HIV infection, considering its diagnosis, was 2.2 years (± 3.2), and 70% of subjects showed a CD4+ T cells count lower than 500 cells/mm³ in the first collection, with *nadir* of 335.7 ± 211.3 cells/mm³.

Furthermore, 30.0% were active smokers, 23.3% practiced intense physical activity and 6.6% were taking anxiolytics and/or antidepressants.

Results from the following tests were collected from the medical records: plasma HIV viral load (VL), CD4+ T cells count, glucose, triglycerides, total cholesterol, and C-reactive protein (CRP). Adherence to cART was considered, at first, based on the reports of patients, and subsequently verified with the records of medicine withdrawal, at the pharmacy service.

Performance of laboratory tests:

Twelve milliliters of blood were collected into an EDTA containing tube from each patient included in the study. The sample was maintained in a cooled and dark environment for 2-3 hours and, then centrifuged at 1,500 rpm for 10 minutes. Six plasma aliquots per individual were stored at -80°C until the tests were performed.

- Measurement of plasma HMGB1: a sandwich-type immunoenzymatic assay (ELISA) was performed, using 100 μ L of diluted sample (1:10) and following the manufacturer's specifications from commercial kit (*MyBioSource*, item MBS2707497). Plasma HMGB1 concentration was determined by spectrophotometry, at 450 nm. Results were expressed as pg/mL using the optical density (OD) of the curves and samples for this calculation.

- Measurement of plasma AGEs: a commercial ELISA kit (*CellBiolabs Inc*, item STA-317) was used following the protocol provided by the manufacturer, with 100 μ L of pure sample. Absorbance was read by a spectrophotometer at a wavelength of 450 nm and, based on the OD of the sample and curve, AGEs levels were calculated in μ g/mL.
- Measurement of sRAGE: using 100 μ L of pure samples, the sandwich ELISA protocol was developed according to the manufacturer's instructions (*R&D Systems*, item DRG00). Reading was performed immediately by a spectrophotometer at the wavelength of 450nm. OD of the samples and curve were calculated and expressed in pg/mL.
- Measurement of IL-6, IL-8 and IL-10: cytokine measurement was performed by flow cytometry (*FACSCalibur-E34297502374*) using the CBA (cytometric bead array) kit of inflammatory cytokines, according to the manufacturer's instruction manual (*BD-Becton, Dickinson and Company*, item 551811). The fluorescence intensity, from the cytometer, showed the amount of cytokines present in the sample. With the samples, standards containing known concentrations of each cytokine were analyzed together for the drawing of the curve, reading and establishment of the respective detection limits. Results were obtained in pg/mL by the software *FCAP array*TM (*BD-Becton, Dickinson and Company*).

Analysis of results:

Continuous variables were expressed as mean (ME) and standard deviation (SD) and categorical variables by frequency and percentage (%). We used Poisson test or Gamma distribution for non-parametric variables and Negative Binomial or One-way ANOVA with subsequent Tukey-Kramer post-hoc test for those parametric data. We also performed Pearson correlations. All calculations were adjusted for age, sex and tobacco use, practice of intense physical activity and use of anxiolytics and/or antidepressants.

Significant differences were considered when *p* values were less than or equal to 0.05. All analyses were performed with help from professionals at the institution's Research Support Office, using SAS for Windows, version 9.2.

Results

In this study, we observed an increase in the patients' CD4⁺ T counts (454.69 ± 136.38 vs 625.07 ± 276.94 cells/mm³, $p < 0.0001$) after cART (Table1). It is noteworthy that the average of CD4⁺ T cells gain was 170.38 cells/mm³ and it was higher in individuals with

a count lower than 500 cells/mm³ (209.71 cells/mm³) at the beginning of therapy, compared to those with an initial count above 500 cells/mm³ (109.62 cells/mm³).

Among the PLWHA studied, 83.3% were under a therapeutic regimen consisting of the non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTI), and 80.0% had undetectable VL at M1. At the moment of this second collection, the participants were asked about adherence to therapy, which was reported by 86.6% of them. The average of VL measurements in pre-cART was 126,550.8 ($\pm 69,756.2$) RNA copies/mm³. At M1 80.0% of the patients had undetectable VL, in the remaining 20% patients VL was 30,813.3 ($\pm 27,463.9$) RNA copies/mm³. Viral load differences between M0 and M1 reached statistical significance ($p=0.019$) (Table 1).

Table 1. Clinical data of 30 PLWHA before and after cART initiation.

Variable	M0 (MEAN $\pm$ SD)	M1 (MEAN $\pm$ SD)	P value
CD4+ T count (cells/mm ³)	454.69 $\pm$ 136.38	625.07 $\pm$ 276.94	<.0001
HIV VL (RNA copies/mm ³)	126,550.8 $\pm$ 9,756.2	30,813.3 $\pm$ 27,463.9	0.019
Undetectable HIV VL	-	80.0%	-
cART Regimen - NNRTI	-	83.3%	-

PLWHA- people living with HIV/AIDS; cART- combined antiretroviral therapy; VL- viral load; NNRTI- non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor; M0- before cART initiation; M1- after cART initiation. *Statistical tests:* Gamma Distribution for CD4+ T cell count and Poisson to HIV VL.

Differences in triglyceride serum levels were observed as well (142.90 $\pm$ 53.38 vs 184.90 $\pm$ 115.07 mg/dL, $p=0.001$) comparing M0 and M1. Conversely, no differences in glucose and total cholesterol were observed at the two moments (Figure 1).

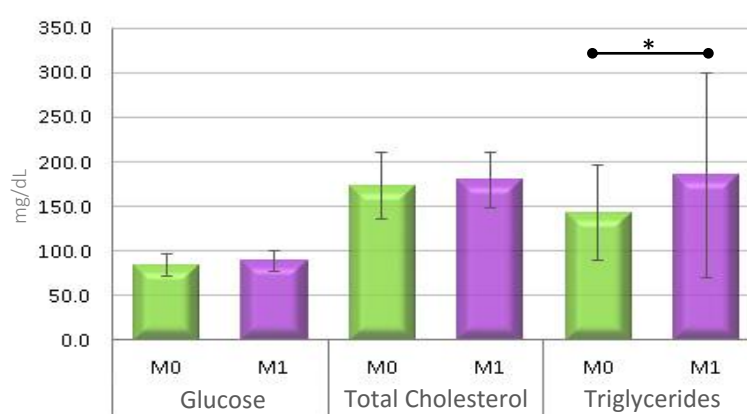


Figure 1. Mean of blood glucose measurements, total cholesterol and triglycerides of 30 PLWHA, before and after cART initiation.

PLWHA- people living with HIV/AIDS; cART- combined antiretroviral therapy; M0- before cART initiation; M1- after cART initiation. *Statistical tests:* Gamma Distribution for triglycerides and ANOVA with post-hoc Tukey tests for the other variables. * $p<0.001$.

After cART introduction, AGEs plasma levels (0.64 ± 0.12 vs 0.49 ± 0.10 pg/mL, $p < 0.001$) decreased significantly (Figure 2). In order to investigate the influence of CD4⁺ T cells on this change, patients were divided into two groups according to their CD4 T counts at M0 ($>$ or $<$ than 500 CD4 cells/mm³, $n=11$ and 19 individuals, respectively). Results suggest that AGEs decrease occurred only in individuals with an initial CD4⁺ T count below 500 cells/mm³ ($p=0.049$).

There were no differences for sRAGE ($1,162.32 \pm 463.44$ vs $1,267.50 \pm 599.93$ pg/mL, $p=0.175$) or HMGB1 (653.87 ± 167.19 vs 575.04 ± 177.61 pg/mL, $p=0.119$) as shown in Figure 2.

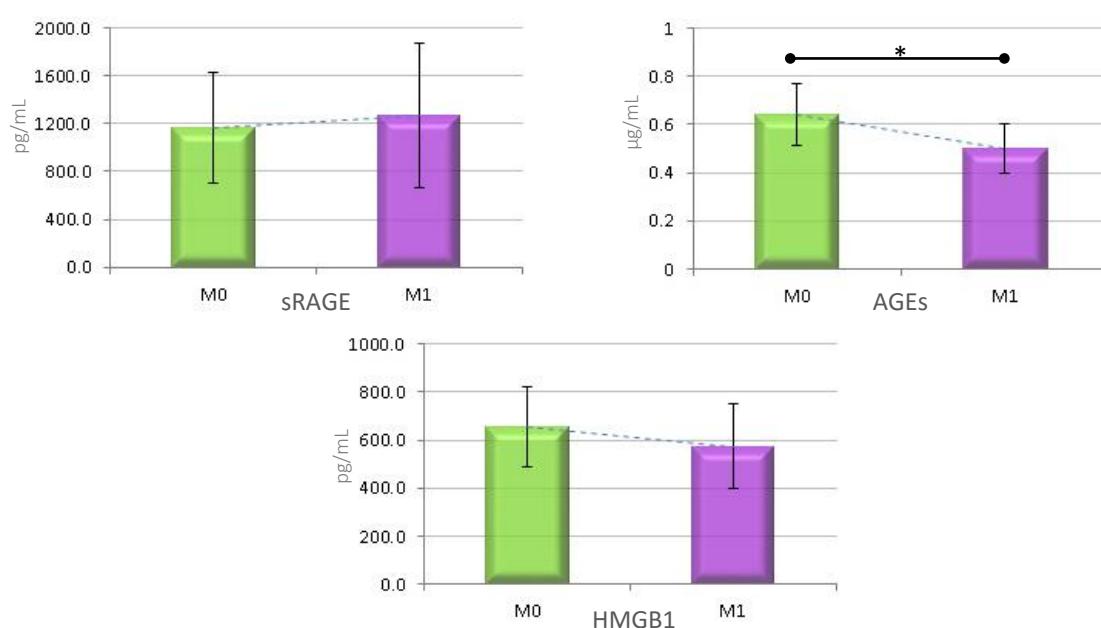


Figure 2. Plasma levels of RAGEs, AGEs, and HMGB1 of 30 PLWHA, before and after cART initiation.

PLWHA- people living with HIV/AIDS; cART- combined antiretroviral therapy; AGEs- advanced glycation end products; sRAGE- soluble receptor of AGEs; HMGB1- high mobility group box protein-1. M0- before cART initiation; M1- after cART initiation. *Statistical tests:* ANOVA with post-hoc Tukey tests. * $p < 0.0001$.

CRP levels also increased after six months of cART (0.74 ± 0.41 vs 1.06 ± 0.99 mg/dL, $p=0.006$); however, no differences in cytokine levels were observed comparing M0 and M1 (Figure 3).

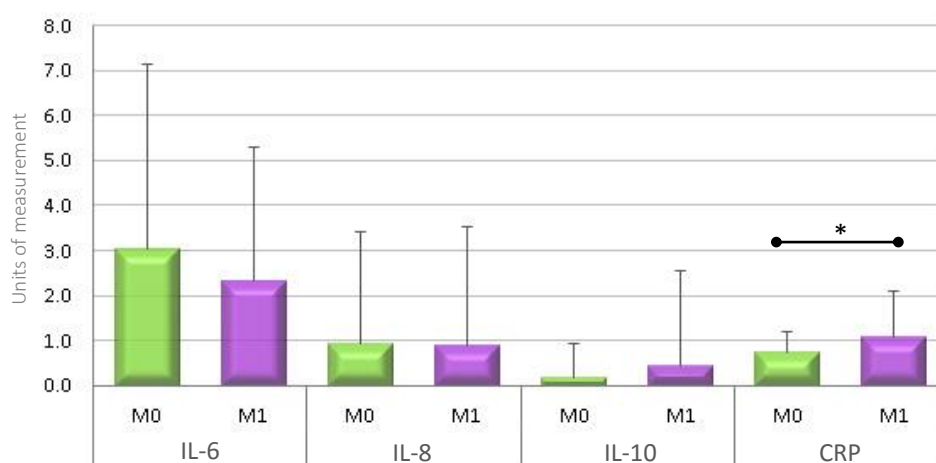


Figure 3. Changes in plasma levels of cytokines and CRP of 30 PLWHA, before and after cART initiation.

PLWHA- people living with HIV/AIDS; cART- combined antiretroviral therapy; IL- interleukin; CRP- C-reactive protein; M0- before cART initiation; M1- after cART initiation. *Statistical tests:* Gamma Distribution. * $p < 0.01$. Units of measurement: 'mg/dL' to CRP and 'pg/mL' to cytokines.

IL-10 level was positively correlated with IL-6, IL-8 and CRP, which also occurred between the variables sRAGE and HMGB1. CD4⁺ T cell count was negatively correlated with IL-6 and IL-8.

Discussion

The risk of progression to AIDS and death are related to high viremia and low CD4⁺ T lymphocyte levels [33], which reinforces the importance of adherence to cART and regular monitoring of all these parameters in the clinical practice. The majority of treatment-naïve patients who start cART show a decrease in VL to undetectable levels (<40 copies/mm³) and an increase in CD4⁺ T cell counts after approximately six months of therapy [1]. These trend mirrors the results obtained in this study as well as the actual tendency in Brazil, as shown in the last Epidemiological Bulletin, where undetectable VL is achieved by 78% of the patients [4] after therapy in both 2013 and 2014.

In order to delay the decrease in CD4⁺ T cells to very low levels, current recommendations are to begin treatment as soon as the diagnosis of HIV infection is confirmed, regardless of CD4⁺ T counts. Despite this knowledge, 26% of Brazilians have a

very late diagnosis, when their CD4⁺ T count is below 200 cells/mm³ and, as a result, they also begin treatment later [4]. Likewise, in this study, 70% of the patients showed fewer than 500 cells/mm³ and a *nadir* of 335.7 cells/mm³ at M0. However, similarly to a previous study performed by our research group [34] the gain of CD4⁺ T cells after cART was more evident in patients who had lower counts at M0.

Despite the benefits of cART in the stabilization of HIV infection, there is evidence that the therapy is accompanied by some adverse effects, especially considering its long-term administration [9,35]. Although, increased oxidative stress [35] and dyslipidemia [9,36] are some of the most evident side effects. In our study, no differences in glucose and total cholesterol levels were observed after therapeutic intervention. However, we cannot exclude that longer treatment could provoke these problems, as Pinto-Neto *et al.* [35] observed that dyslipidemia and glucose disturbances occurred after three years of cART use. On the other hand, in our study, patients showed a significant increase in triglyceride levels already in the first months of treatment, with no influence of the scheme used, protease inhibitors (PI) or NNRTI (data not showed). However, other authors reported that the metabolic imbalance may be associated with different cART regimens, especially those including some PI [36]. Such changes should be monitored, as they contribute to the appearance of comorbidities not related to AIDS, such as cardiovascular disease and diabetes *mellitus* [8].

Early aging has been associated with and explained by the persistent immune activation and inflammation shown by HIV-infected individuals due to residual HIV replication in lymphoid tissues, the intense microbial translocation that may occur, the metabolic imbalance, the instability of the cytokine profile and of the redox status, among others [7,37-39]. It is known that cART reduces inflammation, but does not restore the physiological base level [3,7]. Referring to the inflammatory process, cytokines and CRP measurements were studied here before and after cART introduction. No significant statistical differences were observed in IL-6, IL-8 and IL-10 levels production, although IL-6 have presented a slightly lower value and the IL-10 levels were more prevalent after cART initiation. Other authors reported a decrease in IL-6 synthesis after therapy introduction, considering a longer intervention, of one to two years [40] so, this inconsistency may be related to the short period of cART administration in our study.

In the present study, the CRP levels of all patients was normal or slightly high, considering the reference value at the two moments studied, however a significant increase in its synthesis was observed after treatment. Thus, these results do not seem to suggest a contribution from cART to inflammation decrease during the study period. However, another

study [41] showed that CRP levels decrease following cART treatment, although they are still maintained at high levels. These authors related greater levels of CRP to high mortality rates due to cardiovascular alterations after a short period in malnourished HIV-infected adults in Africa, the possible explanation of which was the persistent chronic inflammatory process [41]. Neaton *et al.* [42], in a review study, observed that both CRP and IL-6 were related to the progression of HIV infection to AIDS and/or death, as well as to some causes of death, such as cardiovascular diseases.

The present research investigated other three poorly studied parameters, AGEs and HMGB1, which are involved in the induction of cellular activation and trigger inflammatory responses, and sRAGE, which plays the opposite effect.

After cART initiation, AGEs plasma levels decreased significantly. Little is known about AGEs concentrations and their effect on the pathogenesis of HIV infection, especially *in vivo*. To our knowledge, this is the first study to evaluate the effect of cART on the levels of AGEs in PLWHA. However, different reports suggest that their high levels are related to the development of various comorbidities in non HIV-infected individuals, mainly aging-related complications, such as cataract formation, atherosclerosis [23,43], osteoporosis [12] Alzheimer's disease [15], chronic kidney disease and diabetes *mellitus* [14,23]. With this regard, cART seems to contribute to improve this parameter. However, in our study this improvement was evident only in patients who began cART with lower CD4⁺ T counts (<500 cells/mm³), at least after a short-term period of therapy. Further analyses in long-term cART period are needed to monitor this key parameter in PLWHA.

Differences in sRAGE levels before and after cART introduction were not observed in the present study, possibly because of the short interval analyzed. After all, firstly AGEs activate the inflammatory cascade with consequent production of IL-6, and it is probably only after such induction that sRAGE increase in the circulation occurs [44]. Hence, after cART and with the decrease in AGEs levels, there may have been lower cell stimulation and lower sRAGE production. Another hypothesis is that even with a slight, non-significant post-therapy sRAGE increase, there may have been a larger capture of AGEs by these soluble receptors, thus significantly reducing their circulating levels in HIV patients post-cART.

Studies on sRAGE are scarce in the field of HIV/AIDS despite its importance for both virus pathogenesis and the management of chronic diseases in infected individuals. Jeong *et al.* [20] found that high concentrations of sRAGE were related to lower development of atherosclerosis in PLWHA, suggesting a protective role for this marker in one of the major and most serious comorbidities found in these individuals. Thus, these authors [20] suggested

that the measurement of plasma sRAGE could be used in clinical practice in an attempt to predict cardiovascular risk in PLWHA. The same authors also showed no differences between the cART classes used, although most patients with high sRAGE were under a NNRTI regimen. Likewise, in the present study, the majority of patients (83.3%) were receiving a scheme consisting of NNRTI, which referred to efavirenz. Moreover we did not find any relation between the cART classes used by our patients and the alterations in the studied biomarkers (data not showed).

High systemic levels of HMGB1 also are found in many chronic proinflammatory conditions, including diabetes *mellitus* and cancers as well as in acute conditions, such as sepsis [16,32,45]. An interesting finding is that HMGB1 can bind and catalyze the movement of LPS monomers from LPS aggregates thus favoring LPS binding to CD14 which eventually increase TNF- α production, via TLR4 activation [27]. Also, monocyte stimulation with both LPS and HMGB1 results in an increased production of TNF- α than with LPS alone [27]. This indicates that HMGB1 may also induce HIV reactivation in PBMC of individuals under cART [46]. However, in this study, no differences were observed in HMGB1 levels between the pre and post-cART. In contrast, other studies have shown increased levels of HMGB1 in PLWHA in relation to the uninfected population, mainly in patients with advanced disease [47,48]. Association between this marker and the VL of the patients was also observed by Trøseid *et al.* [48], in addition to the reduction in both after two years of cART. This was another aspect not observed in this study, perhaps due to the short period analyzed.

Although the present study has analyzed a small sample and does not present data on the dietary inquiries of patients, which may also influence the levels of AGEs [49] and of some metabolic parameters, the study population underwent rigorous exclusion criteria in order to minimize possible confounding effects in the results, such as the presence of comorbidities that knowingly induce and are induced by AGEs, sRAGE and HMGB1.

Conclusion

In the first months of cART, there was a decrease in glucose pathway oxidation, reducing AGEs soluble specially in individuals with initial CD4⁺ T <500 cells/mm³, which would indicate lower immune activation and an improvement in the inflammatory status of these patients. However, the analysis of other inflammatory markers did not show such

benefit since the levels of inflammatory cytokines were not modified and those of CRP increased over the same period. Another negative aspect was the increase in triglycerides in this short period. Because HMGB1 and sRAGE levels were not modulated by initial therapy, other pattern-recognition receptors and other products responsible for cell activation and inflammation could be more informative in the analyses of chronic inflammation in HIV-infected individuals.

Therefore, analysis of other markers and further studies with larger cohorts and in the long term are important to clarify the influence of drug treatment on the mechanisms of activation, inflammation and metabolic changes that affect the PLWHA. Thence the incontestable benefits of cART in controlling HIV-infection, some strategies could be useful in preventing / delaying the onset of non-AIDS-defining illnesses, such as physical exercises practice, a balanced diet and other healthy habits.

References

- 1- UNAIDS.org. [Internet]. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS. Global AIDS Response Progress Reporting. [updating 2015]. Available from: <http://www.unaids.org/en/dataanalysis/knowyourresponse/globalaidsprogressreporting/>.
- 2- Rodrigues CS, Guimarães MD, Acurcio FA, Comini CC. Interrupção do acompanhamento clínico ambulatorial de pacientes infectados pelo HIV. Rev Saude Publica. 2003; 37(2):183-90.
- 3- Aberg JA. Aging, inflammation, and HIV. Top Antivir Med. 2012; 20(3):101-5.
- 4- Ministério da Saúde. Departamento de DST, Aids e hepatites virais. Brazil: Boletim Epidemiologia Dst Aids; 2014. 84 p.
- 5- Guaraldi G, Orlando G, Zona S, Menozzi M, Carli F, Garlassi E, et al. Premature age-related comorbidities among HIV-infected persons compared with the general population. Clin Infect Dis. 2011; 53(11):1120-6.
- 6- Ramana KV. Effect of highly active antiretroviral therapy (HAART) on human immunodeficiency virus disease pathogenesis and progression. Am J Public Health Res. 2014; 2(3):68-74.
- 7- Deeks S. HIV Infection, inflammation, immuno-senescence, and aging. Ann Rev Med. 2011; 62:141-55.
- 8- Venkataramana K. A study of biological markers in HIV disease progression and management in the highly active antiretroviral therapy (HAART) era. Am J Biosci Bioeng. 2013; 1(2):24-37.

- 9- Hulan T, Morrow J, D'Aquila RT, Raffanti S, Morgan M, Rebeiro P, et al. Oxidant stress is increased during treatment of human immunodeficiency virus infection. *Clin Infect Dis*. 2003; 37(12):1711–7.
- 10- Hudson BI, Holmann AM, Bucciarelli L, Wendt T, Moser B, Lu Y, et al. Glycation and diabetes: The RAGE connection. *Curr Sci*. 2002; 83(12): 1515-21.
- 11- Knysz B, Szetela B, Gładysz A. Pathogenesis of HIV-1 infection - chosen aspects. *HIV & AIDS Review*. 2007; 6(1)7-11.
- 12- Pietschmann P, Mechtcheriakova D, Meshcheryakova A, Föger-Samwald U, Ellinger I. Immunology of Osteoporosis: A Mini-Review. *Gerontology*. 2015. [Epub ahead of print].
- 13- Kaneko M, Bucciarelli L, Hwang YC, Lee L, Yan SF, Schmidt AM, et al. Aldose reductase and AGE-RAGE pathways: key players in myocardial ischemic injury. *Ann N Y Acad Sci*. 2005; 1043:702–9.
- 14- Huebschmann AG, Regensteiner JG, Vlassara H, Reusch JE. Diabetes and advanced glycoxidation end products. *Diabetes Care*. 2006; 29(6):1420-32.
- 15- Srikanth V, Maczurek A, Phan T, Steele M, Westcott B, Juskiw D, et al. Advanced glycation endproducts and their receptor RAGE in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2011; 32(5):763-77.
- 16- Sims GP, Rowe DC, Rietdijk ST, Herbst R, Coyle AJ. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annu Rev Immunol*. 2010; 28:367–88.
- 17- Kierdorf K, Fritz G. RAGE regulation and signaling in inflammation and beyond. *J Leukoc Biol*. 2013; 94(1):55-68.
- 18- Kalea AZ, Schmidt AM, Hudson BI. RAGE: a novel biological and genetic marker for vascular disease. *Clin Sci (Lond)*. 2009; 116(8):621–37.
- 19- Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM. The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J Clin Invest*. 2001; 108(7):949–55.
- 20- Jeong SJ, Kim CO, Song YG, Baek JH, Kim SB, Jin SJ, et al. Low plasma levels of the soluble receptor for advanced glycation end products in HIV-infected patients with subclinical carotid atherosclerosis receiving combined antiretroviral therapy. *Atherosclerosis*. 2011; 219(2):778-83.
- 21- Santilli F, Bucciarelli L, Noto D, Cefalu AB, Davi V, Ferrante E, et al. Decreased plasma soluble RAGE in patients with hypercholesterolemia: effects of statins. *Free Radical Biol Med*. 2007; 43(9):1255–62.
- 22- Geroldi D, Falcone C, Emanuele E, D'Angelo A, Calcagnino M, Buzzi MP, et al. Decreased plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end-products in patients with essential hypertension. *J Hypertens*. 2005; 23(9):1725–9.

- 23- Kilhovd BK, Berg JT, Birkeland KI, Thorsby P, Hanssen KF. Serum levels of advanced glycation endproducts are increased in patients with type 2 diabetes and coronary heart disease. *Diabetes Care*. 1999; 22(9):1543–8.
- 24- Thomas JO. HMG1 and 2: architectural DNA-binding proteins. *Biochem Soc Trans*. 2001; 29(Pt 4):395–401.
- 25- Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*. 2002; 418:191–195.
- 26- Tian J, Avalos AM, Mao SY, Chen B, Senthil K, Wu H, et al. Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat Immunol*. 2007; 8(5):487-96.
- 27- Youn JH, Oh YJ, Kim ES, Choi JE, Shin JS. High mobility group box 1 protein binding to lipopolysaccharide facilitates transfer of lipopolysaccharide to CD14 and enhances lipopolysaccharide-mediated TNF-alpha production in human monocytes. *J Immunol*. 2008; 180(7):5067-74.
- 28- Urbonaviciute V, Furnrohr BG, Meister S, Munoz L, Heyder P, De Marchis F, et al. Induction of inflammatory and immune responses by HMGB1-nucleosome complexes: implications for the pathogenesis of SLE. *J Exp Med*. 2008; 205(13):3007-18.
- 29- Gougeon ML, Melki MT, Saïdi H. HMGB1, an alarmin promoting HIV dissemination and latency in dendritic cells. *Cell Death Differ*. 2012; 19(1):96–106.
- 30- Andersson U, Harris HE. The role of HMGB1 in the pathogenesis of rheumatic disease. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1799(1-2):141-8.
- 31- Yasuda T, Ueda T, Takeyama Y, Shinzeki M, Sawa H, Nakajima T, et al. Significant increase of serum high-mobility group box chromosomal protein 1 levels in patients with severe acute pancreatitis. *Pancreas*. 2006; 33(4):359-63.
- 32- Zhang S, Zhong J, Yang P, Gong F, Wang CY. HMGB1, an innate alarmin, in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Int J Clin Exp Pathol*. 2009; 3(1):24-38.
- 33- Havlir DV, Marschner IC, Hirsch MS, Collier AC, Tebas P, Bassett RL, et al. Maintenance antiretroviral therapies in HIV-infected patients with undetectable plasma HIV RNA after triple-drug therapy. *N Engl J Med*. 1998; 339(18):1261-8.
- 34- Fukumoto AECG, Oliveira CC, Tasca KI, Souza LR. Evolution of patients with AIDS after cART: clinical and laboratory evolution of patients with AIDS after 48 weeks of antiretroviral treatment. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2013; 55(4):267-73.
- 35- Pinto Neto LF, das Neves MB, Ribeiro-Rodrigues R, Page K, Miranda AE. Dyslipidemia and fasting glucose impairment among HIV patients three years after the first antiretroviral regimen in a Brazilian AIDS outpatient clinic. *Braz J Infect Dis*. 2013;17(4):438–43.
- 36- Souza SJ, Luzia LA, Santos SS, Rondó PH. Lipid profile of HIV-infected patients in relation to antiretroviral therapy: a review. *Rev Assoc Med Bras*. 2013; 59(2):186–98.

- 37- Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med.* 2006; 12(12):1365-71.
- 38- Hsu DC, Sereti I, Ananworanich J. Serious Non-AIDS events: Immunopathogenesis and interventional strategies. *AIDS Res Ther.* 2013; 10(1):29.
- 39- Hunt PW. HIV and inflammation: Mechanisms and consequences. *Curr HIV/AIDS Rep.* 2012; 9(2):139-47.
- 40- Hattab S, Guihot A, Guiguet, Fourati S, Carcelain G, Caby F, et al. Comparative impact of antiretroviral drugs on markers of inflammation and immune activation during the first two years of effective therapy for HIV-1 infection: an observational study. *BMC Infect Dis.* 2014; 14:122.
- 41- Bestawros M, Chidumayo T, Blevins M, Canipe A, Bala J, Kelly P, et al. Increased systemic inflammation is associated with cardiac and vascular dysfunction over the first 12 weeks of antiretroviral therapy among undernourished, HIV-infected adults in Southern Africa. *J AIDS Clin Res.* 2015; 6(3):431.
- 41- Neaton JD, Neuhaus J, Emery S. Soluble biomarkers and morbidity and mortality among people infected with HIV: summary of published reports from 1997 to 2010. *Curr Opin HIV Aids.* 2010; 5(6):480-90.
- 43- Semba RD, Nicklett EJ, Ferrucci L. Does accumulation of advanced glycation endproducts contribute to the aging phenotype? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2010; 65(9): 963–75.
- 44- Serban AI, Stanca L, Geicu OI, Dinischiotu A. AGEs-induced IL-6 synthesis precedes RAGE up-regulation in HEK 293 Cells: An alternative inflammatory mechanism? *Int J Mol Sci.* 2015; 16(9):20100-17.
- 45- Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science.* 1999; 285(5425):248-51.
- 46- Thierry S, Gozlan J, Jaulmes A, Boniface R, Nasreddine N, Strauss F, et al. High-mobility group box 1 protein induces HIV-1 expression from persistently infected cells. *AIDS.* 2007; 21(3):283–92.
- 47- Nowak P, Barqasho B, Sonnerborg A. Elevated plasma levels of high mobility group box protein 1 in patients with HIV-1 infection. *AIDS.* 2007; 21(7):869-71.
- 48- Trøseid M, Sönnernborg A, Nowak P. High mobility group box protein-1 in HIV-1 infection: Connecting microbial translocation, cell death and Immune activation. *Curr HIV Res.* 2011; 9(1):6-10.
- 49- Vlassara H. Advanced glycation in health and disease. Role of the modern environment. *Ann N Y Acad Sci.* 2005; 1043:452-60.

Antiretroviral therapy initiation alters the redox system of asymptomatic HIV-infected individuals.

Running title: Oxidative Stress After initial cART

Karen I. Tasca^{1§}, Juliana C. Trindade¹, Camila R. Correa², Mariana Gatto¹, Francilene C. Tavares¹, Caio C. Camargo¹, Alexandrina Sartori¹, Mara Biasin³ e Lenice R. Souza¹.

¹ *Department of Tropical Diseases, Botucatu Medical School (FMB), Univ Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, Brazil.*

² *Department of Pathology, FMB/UNESP, Botucatu, Brazil.*

³ *Department of Biomedical and Clinical Sciences, University of Milan, Milan, Italy.*

Keywords: HIV/Aids, Asymptomatic, cART, Oxidative Stress, DNA Damage, Vitamins, Antioxidants, 8-isoprostane, Malondialdehyde.

Abstract

More than 30 years after the description of the first cases of HIV infection, the scenario of this epidemic has changed and the infection has become a chronic disease, mainly due to its effective treatment. However, the combination antiretroviral therapy (cART) also appears to contribute to increase oxidative stress in these patients, which in turn can be associated with the onset and aggravation of non-AIDS comorbidities, the major cause of death for these individuals. The purpose of this longitudinal study was to evaluate total antioxidant capacity, fat-soluble vitamins, malondialdehyde, 8-isoprostane and DNA damage in 30 asymptomatic patients before (M0) and after (M1) cART initiation. Results showed a decrease in total antioxidant capacity, retinol, α -tocopherol and some carotenoids after cART, in addition to a significant increase in DNA damage at M1, and these changes were more evident in individuals with high CD4⁺ T cell counts at the moment of therapeutic onset. Moreover, there was a significant 8-isoprostane increase at M1 in individuals with an initial CD4⁺ T count below 500 cells/mm³. Therefore, considering the increasingly early beginning of cART, its chronic use and its capacity to alter the redox status already within the first 6 months of use, further long-term studies on larger cohorts are needed to define the best time to initiate therapy as well as to investigate new strategies to delay the development of non-AIDS diseases.

Introduction

Even though HIV infection is currently considered to be a chronic disease due to technological advances, early diagnosis and effective treatment, it is still regarded as one of the biggest public health problems because of its severity and pandemic character. However, the impact of this epidemic would be much greater if the strategy of combining different drugs in antiretroviral therapy (cART) would not have changed the natural history of the disease, with a dramatic reduction in the rates of morbidity and mortality [1].

Nowadays, there is increasingly early recommendation for therapeutic beginning, a strategy to promote benefits for patients and to reduce transmission rates [1-3]. However, due to prolonged use of cART, its toxic effects should be taken into account. In addition to kidney, liver and bone impairment, many drugs are responsible for the onset of the metabolic syndrome and consequently for the increase of non-AIDS comorbidities that lead to the current causes of death in this population such as cardiovascular disease and diabetes mellitus, among others [1,4-6].

cART also seems to contribute to the imbalance between oxidants and antioxidants in people living with HIV/AIDS (PLWHA) by increasing the former and decreasing the latter [6-8]. Such oxidative stress results in dysregulation of signaling and redox control, possibly leading to molecular damage [9]. As a result of this process, genotoxic and mutational effects contributing to the development of cancer and other non-AIDS diseases may occur [10,11], and such homeostatic instability could even accelerate the progression of HIV infection to AIDS [11].

In relation to oxidative stress, the literature points out that lipid peroxidation, as measured, for example, by serum analysis of malondialdehydes (MDA) [12,13] and 8-isoprostanes [6,14], is higher in PLWHA, compared to non-infected individuals [12,13], and it increases following cART initiation [6,14]. In addition, these individuals have less total antioxidant capacity [15] and a lower vitamin profile [8,16] as compared to patients naïve to treatment, thus showing that not only the pathogenesis of HIV but also the therapy may influence the increase in pro-oxidants and the decrease in antioxidants in infected people, leading to consequent damage to molecules, proteins, cells and tissues [17].

The objective of this study was to analyze the influence of cART initiation on oxidative stress parameters in asymptomatic HIV-infected individuals by plasma analysis of MDA, 8-isoprostanes, vitamins profile and total antioxidant capacity, in addition to genotoxic damage in peripheral blood mononuclear cells (PBMC).

Material and Methods

Study design:

This longitudinal study was conducted between the years 2012 and 2015, on 30 HIV patients attended at the Specialist Outpatient Service for Infectious Diseases "Domingos Alves Meira" (SAEI-DM), at the Botucatu Medical School Complex (FMB)-UNESP, in São Paulo state, Brazil. This Service covers about 600 people from Botucatu city and surrounding area and, for this study, were interviewed 150 people, being included only 30 of them after applying the exclusion criteria. The collections of data and biological samples were carried out in two stages: before therapy initiation (M0) and approximately six to twelve months after that intervention (M1).

As well as in some other countries, in Brazil, where this study was conducted, the current recommendation by the Ministry of Health is that cART should be offered to all those infected with HIV, regardless of CD4⁺ T counts [2]. However, until December 2013, the treatment was indicated only for asymptomatic individuals with CD4⁺ T counts below 500 cells/mm³. Therefore, we also analyzed oxidative stress parameters, according to the CD4⁺ T cell counts pre-cART. Thus, the subjects were divided into two groups considering the initial CD4⁺ T cell count, G1 and G2, comprising individuals presenting fewer or more than 500 cells/mm³, respectively.

Inclusion and exclusion criteria:

The inclusion criteria were: age, comprised between 20 and 50 years old, no previous cART administration, signing an Informed Consent Form.

Patients excluded were those with any of the following conditions: use of vitamin supplements, cancer history (current or previous), anorexia, morbid obesity, diabetes *mellitus*, cardiovascular, genetic or autoimmune diseases, organ transplants, pregnancy at any stage or breastfeeding, co-infections such as tuberculosis, chronic viral hepatitis, cerebral or disseminated toxoplasmosis, use of illicit drugs and alcohol.

For the following criteria, exclusion occurred when patients concomitantly reported two of them or more: regular performance of intense physical exercise; use of antibiotics, anxiolytics or antidepressants; active smoking. People with only one of these conditions were included because the statistical analysis was conducted in adjusted models for these variables.

Socio-demographic and clinical data:

Socio-demographic and clinical data were collected by interviews and from the patients' medical records.

Performance of laboratory tests:

Twelve milliliters of blood were collected into an EDTA containing tube from each patient included in the study. The material was maintained in a cooled and dark environment for 2-3 hours. After that, 60 μ L of total blood were separated for the Comet Assay procedure. Then, the remaining sample was centrifuged at 1,500 rpm for 10 minutes. Six plasma aliquots per individual were stored at -80°C until the tests were performed. We analyzed the following variables: lipid peroxidation (malondialdehyde and 8-isoprostane), DNA damage, total antioxidant capacity and vitamin profile with dosages of carotenoids (lutein, cryptoxanthin, β -carotene and lycopene), retinol and α -tocopherol.

- *Measurement of lipid peroxidation by analysis of malondialdehyde (MDA)*: the high performance liquid chromatography (HPLC) technique was performed by using the *Scimadzu* HPLC System and by the method proposed by Nielsen *et al.* [18], with 100 μ L of plasma. For quantification of chromatograms, a comparison was made between the substance area and the pattern area, and the result was expressed by $\mu\text{mol/L}$.
- *Evaluation of lipid peroxidation by analysis of 8-isoprostane*: the immunoenzymatic assay (ELISA) was developed according to the manufacturer's instructions (*Cayman*, item 516351) using 50 μ L of plasma. The optical densities were calculated for the unit in pg/mL .
- *Analysis of DNA damage by Comet Assay*: it was developed according to Sasaki *et al.* [19] using 30 μ L of whole blood set on a blade with agarose. After being submitted to the lysis solution, triplicates of the blades were subjected to three different conditions in electrophoresis: the basal condition (BAS), with no addition of enzymes, and the addition of the following enzymes: formamidopyrimidine DNA glycosylase (FPG) and endonuclease III (ENDIII) for detection of oxidative damage in purine and pyrimidine bases, respectively (*Biocompare*, CA, USA). The slides were stained by *Sybr Gold* (*Invitrogen* - USA). Using an immunofluorescence microscope connected to an image analysis system (*Comet Assay IV*, *Perceptive Instruments*, *Sufolk*, *Haverhill*, *UK*), a total of 50 randomly selected nucleoids were counted for each slide. Results were expressed as "tail intensity" (ti), which is the percentage of migrated DNA, and "tail

moment” (tm), relative values from the fraction of migrated DNA multiplied by the length of the tail.

- *Analysis of the total antioxidant capacity (TAC)*: using 100 µL of plasma, it was determined calorimetrically in triplicate according to the methodology described by Beretta *et al.* [20] using the VICTOR X2 reader (Perkin Elmer - Boston, MA, USA). Results were expressed as % of protection.
- *Fat-soluble vitamins*: Using 100 µL of plasma, they were measured by HPLC (Waters 2996), by a C30 column (150x4.6 mm, 3 µm) and according to Ferreira *et al.* [21]. The wavelength used was 455 nm for carotenoids (lutein, cryptoxanthin, lycopene and β-carotene), 325 nm for retinol and 290 nm for α-tocopherol. A comparison was performed between the relation of the internal standard area to the obtained substance area for quantification of chromatograms. The values of the standard solution of the substances were fixed by their molar extinction coefficients expressed in µmol/mL.

Analysis of results:

We used the Poisson test or Gamma distribution for non-parametric variables and the Negative Binomial or One-way ANOVA with subsequent Tukey-Kramer post- hoc tests for those parametric data. We also performed Pearson correlations. All calculations were adjusted for age, sex and tobacco use, practice of intense physical activity and use of anxiolytics and/or antidepressants.

Significant differences were considered when *p* values were less than or equal to 0.05. All analyses were performed with help from professionals at the institution's Research Support Office using SAS for Windows, version 9.2.

This research project was approved by the local Research Ethics Committee.

Results

The socio-demographic, clinical and epidemiological characteristics of the subjects included in the study are shown in Table 1.

The evaluation of CD4+ T cell counts in M1 showed an increase (625.07 ± 276.94) in relation to M0 (454.69 ± 136.38 cells/mm³, $p < 0.0001$), which was more evident in G1 compared to G2 (209.71 , versus 109.62 cells/mm³).

No differences were observed in MDA or 8-isoprostane levels after cART initiation; conversely, total antioxidant capacity decreased significantly after cART initiation (61.76 ± 12.30 versus 45.70 ± 7.42 %, $p < 0.001$) as shown in Figure 1.

Table 1. Characterization of 30 PLWHA studied.

Variables	MEAN ($\pm$ SD) or %
Age (years)	34 (± 8.2)
Male gender	60.0%
Smokers*	30.0%
Physical Activities Practice*	23.3%
Use of anxiolytics or antidepressants*	6.6%
Time of HIV Diagnosis (years)	2.2 (± 3.2)
CD4+ T <500 cells/mm ³ (M0)	70.0%
CD4+ T Nadir (cells/mm ³)	335.7 (± 211.3)
Undetectable HIV Viral Load (M1)	80.0%
cART Regimen - NNRTI	83.3%

SD- standard deviation; PLWHA- people living with HIV/AIDS; cART- combined antiretroviral therapy; M0- before cART initiation; M1- after cART initiation; NNRTI- Non-nucleoside reverse-transcriptase inhibitors; *isolated presence of these cited factors (which were not excluded, due the adjustment of statistical analysis fulfilled).

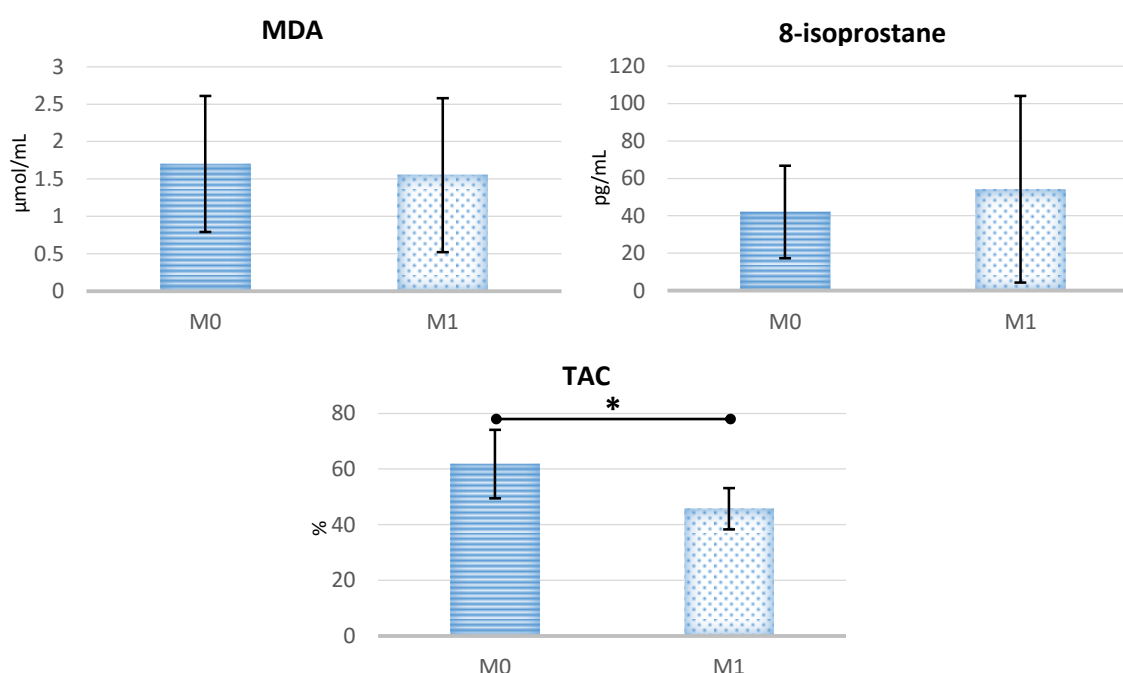


Figure 1. Means of MDA, 8-isoprostane and TAC of 30 PVWHA before (M0) and after (M1) cART initiation.

PLWHA- people living with HIV/AIDS; cART- combined antiretroviral therapy; MDA- malondialdehyde; TAC- total antioxidant capacity; *Statistical tests*: Gamma Distribution for MDA and 8-isoprostane and ANOVA with post-hoc Tukey tests for the TAC. * $p < 0.05$.

In a separate analysis by groups of G1 and G2 patients, there was no difference in MDA comparing M0 and M1. As for 8-isoprostane, there was a difference in G1 subjects, who showed an increase after cART initiation ($p=0.011$). For total antioxidant capacity, both groups showed differences between M0 and M1 ($p<0.001$ for G1 and $p=0.016$ for G2), as shown in Figure 2.

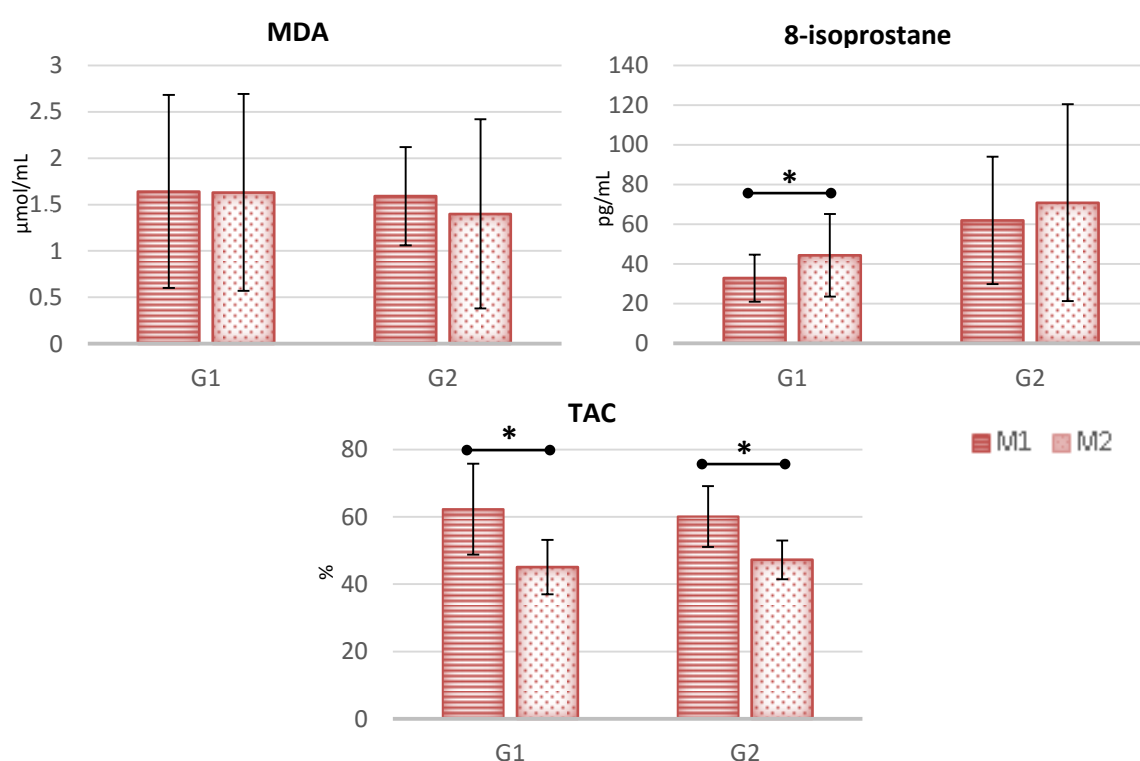


Figure 2. Means of MDA, 8-isoprostane and TAC of 30 PVWHA before (M0) and after (M1) cART initiation, separated into initial CD4+ T groups.

PLWHA- people living with HIV/AIDS; cART- combined antiretroviral therapy; G1- CD4+ T counts <500 , $n=11$; G2- CD4+ T >500 cells/ mm^3 (considering the counts in M0), $n=19$. MDA- malondialdehyde; TAC- total antioxidant capacity; *Statistical tests*: Gamma Distribution for MDA and 8-isoprostane and ANOVA with post-hoc Tukey tests for the TAC. * $p<0.05$.

For carotenoids, comparing M0 and M1, we observed a decrease in lycopene levels (0.66 ± 0.47 versus 0.44 ± 0.24 $\mu\text{mol/L}$, $p=0.015$) β - carotene (0.31 ± 0.39 versus 0.17 ± 0.12 $\mu\text{mol/L}$, $p<0.0001$), α -tocopherol (17.9 ± 8.37 versus 4.14 ± 5.72 $\mu\text{mol/L}$, $p=0.005$), and retinol (2.83 ± 1.40 versus 1.82 ± 0.49 $\mu\text{mol/L}$, $p=0.0021$) as shown in Table 2.

Table 2 also shows comparisons of vitamin profiles between the two groups. After cART a reduction occurred for lutein only in G2 ($p=0.018$), for β -carotene in both G1 and G2 ($p<0.010$), for lycopene only in G2 ($p=0.019$) and for α -tocopherol in both groups ($p<0.050$).

Table 2. General vitamin profile of 30 PLWHA before (M0) and after (M1) cART initiation and its comparison separated into initial CD4+ T groups.

Variables	M0 (MEAN±SD)	M1 (MEAN±SD)	P value
Lutein (μmol/mL)#	0.06 ± 0.06	0.05 ± 0.04	Ns
G1	0.06 ± 0.06	0.05 ± 0.04	Ns
G2	0.06 ± 0.04	0.04 ± 0.03	0.018
Cryptoxanthin (μmol/mL)#	0.08 ± 0.09	0.07 ± 0.07	Ns
G1	0.07 ± 0.05	0.07 ± 0.08	Ns
G2	0.15 ± 0.14	0.07 ± 0.05	Ns
β-Carotene (μmol/mL)#	0.31 ± 0.39	0.17 ± 0.12	<.0001
G1	0.28 ± 0.36	0.15 ± 0.10	0.002
G2	0.31 ± 0.44	0.18 ± 0.17	0.001
Lycopene (μmol/mL)#	0.66 ± 0.47	0.44 ± 0.24	0.015
G1	1.94 ± 3.98	0.45 ± 0.22	Ns
G2	0.86 ± 0.58	0.32 ± 0.26	0.019
α-Tocopherol (μmol/mL)#	17.94 ± 8.37	4.14 ± 5.72	0.005
G1	15.82 ± 8.52	4.29 ± 5.85	0.030
G2	18.78 ± 10.53	3.85 ± 6.19	0.048
Retinol (μmol/mL)#	2.83 ± 1.42	1.82 ± 0.49	0.002
G1	2.47 ± 1.41	1.86 ± 0.51	Ns
G2	2.78 ± 1.75	1.36 ± 0.48	Ns

PLWHA- people living with HIV/AIDS; cART- combined antiretroviral therapy; G1- CD4+ T counts <500, n=11; G2- CD4+ T >500 cells/mm³ (considering the counts in M0), n=19; VL- HIV viral load; SD- standard deviation; Ns- nonsignificant values; #- analysis of the 30 total patients without division into groups. *Statistical tests*: ANOVA with post-hoc Tukey tests for retinol and Gamma Distribution for the other variables.

In relation to the Comet assay, there was a slight increase, not significant, for the "tail moment" (8.32 ± 4.37 versus 14.83 ± 8.95 , $p=0.068$) and "tail intensity" (33.45 ± 14.78 versus 39.85 ± 14.45 , $p=0.097$) relative to slides treated with END in M1 compared to M0 (Figure 3)

However, when the analysis was performed considering the CD4+ T cell groups, there was an increase in DNA damage only for G2, at the "tail moment" of the blades treated with FPG ($p=0.032$) and END ($p=0.050$), and in the "tail intensity" of the blades treated with END ($p=0.012$). These data are shown in Figures 4 and 5.

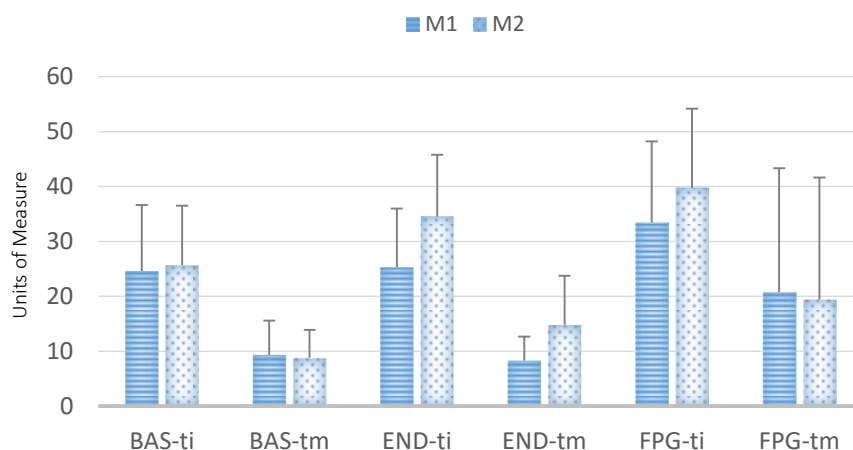


Figure 3. DNA damage of 30 PVHA, before (M0) and after (M1) cART initiation, according to basal (BAS) and enzymatic (END e FPG) conditions.

PLWHA- people living with HIV/AIDS; cART- combined antiretroviral therapy; BAS- basal condition (without enzymes); END- blades treated with the Endonuclease III enzyme (timidina glicol-DNA glicosilase); FPG- blades treated with the formandipirimidina-DNA glicosilase enzyme. *Statistical tests:* Gamma Distribution for Bas-ti and FPG-tm; ANOVA with post-hoc Tukey tests for the other variables. *Units of measure:* ti (tail intensity) and tm (tail moment).

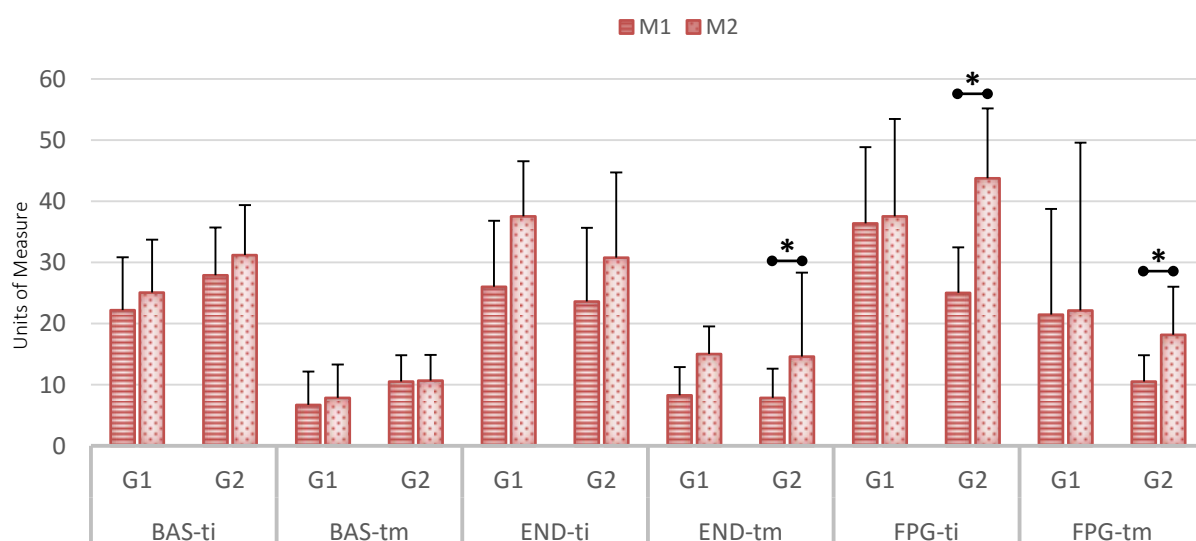


Figure 4. DNA damage of 30 PVHA, before (M0) and after (M1) cART initiation, separate into initial CD4+ T groups and according to basal (BAS) and enzymatic (END e FPG) conditions.

PLWHA- people living with HIV/AIDS; cART- combined antiretroviral therapy; G1- CD4+ T <500, n=11; G2- CD4+ T >500 cells/mm³ (considering the counts in M0), n=19. BAS- basal condition (without enzymes); END- blades treated with the Endonuclease III enzyme (timidina glicol-DNA glicosilase); FPG- blades treated with the formandipirimidina-DNA glicosilase enzyme. *Statistical tests:* Gamma Distribution for Bas-ti and FPG-tm; ANOVA with post-hoc Tukey tests for the other variables. *p<0.05. *Units of measure:* ti (tail intensity) and tm (tail moment).

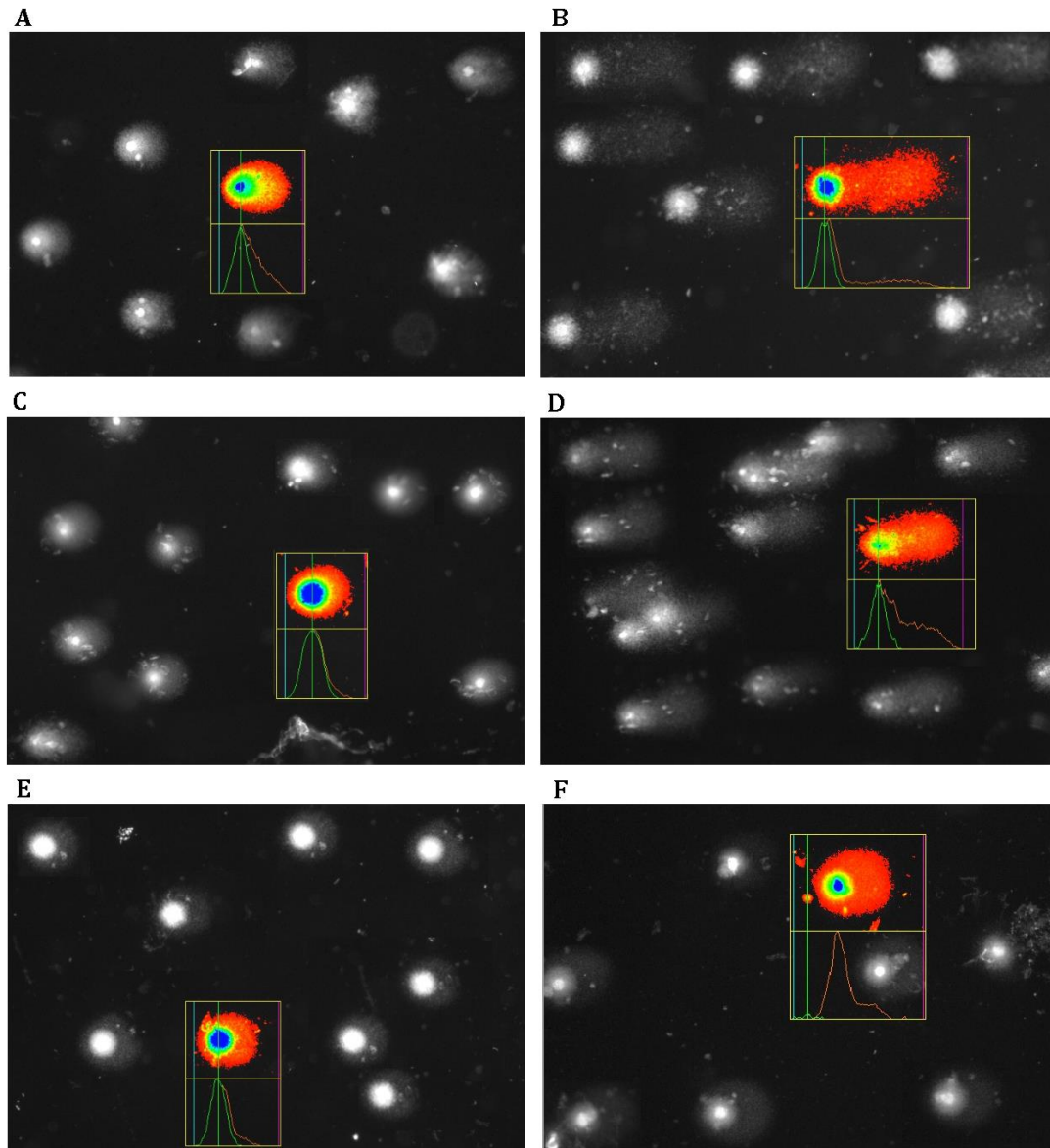


Figure 5. DNA damage before (A, C and E) and after cART initiation (B, D and F), of one HIV-infected subject presenting initial CD4⁺ T counts >500 cells/mm³, in the enzymatic (END [A e B], FPG [C e D]) and basal conditions (BAS [E e F]).

PLWHA- people living with HIV/AIDS; cART- combined antiretroviral therapy; END- blades treated with the Endonuclease III enzyme (timidina glicol-DNA glicosilase); FPG- blades treated with the formandipirimidina-DNA glicosilase enzyme; BAS- basal condition (without enzymes).

Additionally, we found a positive correlation between MDA and the plasma HIV viral load (VL) ($p < 0.001$). Negative correlations occurred between retinol and VL ($p = 0.033$), between α -tocopherol and END-ti ($p = 0.001$) and END-tm ($p = 0.006$), between lycopene and BAS-tm ($p = 0.028$) and between END-ti with lutein ($p = 0.018$), cryptoxanthin ($p = 0.004$) and β -carotene ($p = 0.017$).

Discussion

HIV infection is characterized by severe immunodeficiency, a consequence of CD4⁺ T cells depletion, not only numerical but also functional [3]. The patients studied here presented CD4⁺ nadir of approximately 335 cells/mm³, while the average of these cells before the beginning of cART was above 450/mm³, with an increase after six/12 months (625 cells/mm³). The majority (80%) of participants attained VL undetectability, and these data show improvement in immune-virological parameters.

There is no doubt about the benefits of cART in reducing morbidity and mortality from AIDS [1,3], but its long-term use is related to many adverse events and the development of comorbidities not related to the disease [4,5] that are currently the main cause of death among HIV-infected people. As will be discussed, this study shows increased oxidative stress in individuals who had initiated therapy. With this regard, it is known that the therapy in some individuals may affect mitochondrial morphology and function [22] and the activation of the P450 cytochrome enzyme system [6], which in turn increases the reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species in circulation. This intense generation of free radicals, the intense consumption and the absence/deficiency of antioxidants is responsible for causing damages in cells and tissues. In addition, cART is associated with metabolic disorders that also increase oxidative stress in infected individuals [17].

As to products of lipid peroxidation, differences in MDA values could not be observed here between pre- and post-cART periods, nor by analyzing the groups' initial CD4⁺ T counts. We found only a positive correlation between VL and MDA, which suggests the influence of the viral pathogenic effects on the increase of oxidative stress. A study enrolling children under 10 years and newborns infected with HIV showed higher levels of MDA in those than in healthy children [23]. However, in infected adults there are controversial data on this marker. While some authors [24] also showed no difference in this ratio between HIV-infected or uninfected, symptomatic or asymptomatic patients, others [13,25] have found higher concentrations of MDA in those infected and with low CD4⁺ T counts.

Another marker of oxidative stress based on lipid peroxidation is PGF2 alpha-8-isoprostane or 8-isoprostane, the most abundant compound among F2-isoprostanes. We showed no changes in their levels after the therapeutic beginning, when patients were analyzed together. However, when we analyzed them by groups, patients with initial CD4⁺ T less than 500 cells/mm³ showed a significant increase in 8-isoprostanes after cART compared to the pre-cART moment. Hulgán *et al.* [6] also found elevated plasma concentrations of F2-

isoprostane in PLWHA under cART, who also showed control of viral replication. It is worth mentioning that, in our study, because the analysis was adjusted for gender, age and other variables that could be confounding, it is not possible to compare our findings with those by Crist *et al.* [26], which showed higher 8-isoprostane levels in women as compared to men, both HIV-infected.

Almost all of those 83.3% of individuals who received NNRTI in this study, were in use of efavirenz, nevertheless we did not founded here any influence of antiretroviral classes on the levels of chose parameters (data not showed), perhaps due to the short period of therapy using. With this regard, Hulgán *et al.* [6] Gupta *et al.* [27] showed that F2-isoprostane levels increased in subjects taking efavirenz as compared to those under rilpivirine, a second-generation NNRTI. Different plasma levels of this marker were also found by Redhage *et al.* [14] in a comparison of drug schemes, being higher in patients without NNRTI. In the same study, intermediate levels of 8-isoprostane were found in treatment-naïve patients, and the lowest value was observed for the group with NNRTI, which led to the conclusion that the latter group seemed to have less association with oxidative stress. High concentrations of F2-isoprostanes were also observed in relation to other chronic diseases and habits, such as atherosclerosis [28], Alzheimer [29] and smoking [30], in HIV-uninfected individuals. Thus, there is need for better understanding this and other markers in the pathogenesis of HIV and non-AIDS-related diseases.

For the organism to be able to defend itself from this repertory of pro-oxidants, an effective antioxidant system is needed. Human cells are fraught with endogenous and exogenous antioxidants, enzymatic and non-enzymatic [31]. The measurement of total antioxidant capacity considers the cumulative effect of all antioxidants present in blood and body fluids, considering both lipophilic and hydrophilic compartments [20,32].

In the present study, a decrease in total antioxidant capacity occurred after starting cART, and these data have been corroborated by other authors [15,17]. According to Suresh *et al.* [12] HIV-naïve patients have lower total antioxidant capacity than uninfected individuals, and the decrease was more accentuated in those with CD4⁺ T cells below 500/mm³. Decrease in protection percentage also occurred in the patients studied here, but that was observed when comparing the moments before and after cART and in both groups, in individuals with CD4⁺ T counts below and above 500 cells/mm³. The literature suggests that PLWHA with the metabolic syndrome also showed a decline in total antioxidant capacity, which was independent of the presence of cART in the study by Morimoto *et al.* [17]. However, the findings by Mandas *et al.* [15] also showed that oxidative stress was higher in

patients who adhered to therapy as compared to non-adherents, which reinforces the role of antiretroviral drugs in the induction of these mechanisms.

Low total antioxidant capacity of PLWHA can have several explanations in addition to the toxic effects of cART. One of them would be the high consumption of antioxidants due to high levels of ROS presented by this population [13]. Others would be the lack of antioxidant intake and of their precursors, and/or poor absorption of nutrients resulting from the changes in intestinal homeostasis [13,33]. Aspects related to dietary surveys and clinical manifestations suggestive of the malabsorption syndrome were not assessed in this study, thus comparisons were not possible. Therefore, it is important to investigate which components of the antioxidant system are deficient in this population. This study assessed only some carotenoids (lutein, cryptoxanthin, β -carotene and lycopene), retinol and α -tocopherol.

Carotenoids have been studied over the years not only for their proven pro-vitamin A activity, but also for evidence of other biological properties beneficial to health such as T cell proliferation, decreased apoptosis of B cells, control of Th17 and regulatory T-cell subtypes in the gut and production of local immunoglobulin A [34], as well as in relation to reduction in the risk for degenerative diseases, including certain types of cancer, cardiovascular diseases and ocular degeneration [35]. As the results showed in this study, after cART initiation there was a decrease in retinol, β -carotene and lycopene levels. There was a more significant lycopene drop in the group of subjects with initial CD4⁺ T counts above 500 cells/mm³, who also showed a decrease in post-cART lutein dosages. These data were consistent with those in other studies, which, despite not having divided the participants into groups according to initial CD4⁺ T, noted β -carotene deficiency in HIV-infected individuals [16,36]. A Brazilian research by Kaio *et al.* [16] in São Paulo, found 98% β -carotene deficiency and 4% retinol deficiency in PLWHA. Considering the reference values used by these authors (<1.0 for β -carotene and <0.7 μ mol/L for retinol), similar results were found in the present study, in which 100% of patients had disabilities to β -carotene, and only 6.6% showed retinol deficiency (data not shown). Thus, based on these data, we can share the conclusions of those authors [16] by suggesting that PLWHA would not benefit from vitamin A supplementation, but from β -carotene, as its antioxidant effect could be more beneficial for individuals on cART.

The most abundant active compound of vitamin E, α -tocopherol, also plays an essential role in antioxidant protection as it prevents propagation of lipid peroxidation and reduces damage caused by free radicals [11]. Furthermore, it is related to the reduction of various proinflammatory cytokines [34]. Results of some studies on naïve HIV-infected

individuals [12,37] have shown that the deficiency of this and other micronutrients occurred more significantly in patients with lower CD4⁺ T counts. In our study, as well as other vitamins and their precursors, α -tocopherol showed low levels after cART initiation in both initial CD4⁺ T groups. This reduction may have occurred because of the need for high consumption of antioxidants to block the pro-oxidant, whereas after cART, oxidative stress was higher, as previously mentioned.

Thereby, another study by Kaio *et al.* [8] on HIV-infected individuals on cART compared α -tocopherol levels with antiretroviral classes and showed a prevalence of nearly 20% of PLWHA with disabilities or lower limits of this vitamin [8], which differs from our results, whose proportion was surprisingly higher using the same reference values as those authors'. Here, approximately 60% of the PVHA analyzed before cART introduction showed α -tocopherol deficiency, and after treatment beginning, that percentage increased to almost 90% (data not shown). In an attempt to justify the difference between our results and those in the study by Kaio *et al.* [8], it is necessary to consider some aspects. Although the sample size is larger in the latter, participants in both studies were from the same region and the same Brazilian state, thus it can be assumed that the populations share similar characteristics and similar diet types, for example. In the cross-sectional study by Kaio *et al.* [8], patients were already using cART for an extended period, considering that the average was 10 years and that they had received more than one scheme, including therapeutic rescue. On the other hand, our study has a longitudinal design and treatment duration was only eight months on average, besides the fact that most patients were receiving a scheme with NNRTI. This class of antiretroviral drugs may be associated with the low levels of α -tocopherol found in almost 90% of the individuals studied here.

As a result of this imbalance between pro- and antioxidants, some genotoxic alterations may occur. For the analysis of DNA damage induced by oxidative stress, the comet assay is one of the most often used due to its low cost and versatility. When the subjects were analyzed together, there was no significant difference between the two studied moments, but when they were divided into groups according to initial CD4⁺ T counts, an oxidative genotoxic increase in the group with such count above 500 cells/mm³ was apparent. The increase in DNA damage found in our study could be explained at least in part by the toxicity of cART, but independent of CD4⁺ T counts. There are few studies that compare the use or not of cART with genotoxic changes. Aukrust *et al.* [38] reported that the levels of activity of DNA glycosylase, a genomic damage repair marker, showed an inverse correlation with VL and increased the levels of CD4⁺ T cell counts in seven individuals who used cART

for six months; however, these levels did not match those of 11 healthy subjects who were also studied. The same authors [38] showed a reduction in 8-oxoG (7,8-dihydro-8-oxoguanine), a marker of oxidative DNA damage, in the CD4⁺ T cells from subjects with cART as compared to naïve individuals. Instead, Paul *et al.* [39] analyzed the metabolite 8OH2'dG (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine) excreted in the urine of three groups of PVHA, one untreated, another under cART without lipodystrophy and another under cART but presenting lipodystrophy, and they did not find any differences between the groups.

Finding no other related studies on humans, experimental research on DNA damage utilizing the same technique used here was more related to the possible explanations of the toxic mechanisms of antiretroviral drugs. Accordingly, Oliveira *et al.* [40] showed genotoxic effects in the brains of mice chronically treated with efavirenz and suggested that DNA damage was induced by oxidative stress, which could also explain the neuropsychiatric effects of drug use. However, not only cART is responsible for increasing the frequency of genotoxic damage in PLWHA as compared to uninfected individuals. The very *tat* HIV protein, due to the generation of superoxide anion by mitochondria, induces intracellular ROS production which, in turn, activates NF- κ B, thus enhancing HIV transcription [6] and leading to deficiency in DNA repair and causing genomic instability, which can lead to mutations and contribute to the onset of cancer [11]. Hence, this cell damage may also induce the reactivation of latent viruses, stimulating the production of some inflammatory cytokines [11,15] and the development of malignancies and non-AIDS comorbidities, which would contribute to chronic inflammation and persistent immune activation, increasing oxidative stress in PLWHA.

Despite the limitations in our study, such as a small sample size and the absence of dietary surveys or anthropometric measurements, the studied population underwent rigorous exclusion criteria. Thus, we concluded that in addition to the virus itself being responsible for increased oxidative stress, cART considerably increases such stress in infected asymptomatic HIV-infected individuals already in the first months of therapy use. This would lead to diminished total antioxidant capacity, including the vitamin profile, thus contributing to more genotoxic damage in these patients, mainly in those with high values of CD4⁺ T pre-therapy (>500 cells/mm³). For us, the reduction of inflammation after therapeutic beginning, which is only partial as reported in the literature, could be a result of both inflammation drop due to the control of viremia and by increased inflammation caused by toxic effects of HAART, besides the residual replication that it occurs in viral reservoirs.

Therefore, despite the evident benefits of treatment, there is a need for further studies with larger cohorts and more discussion about the best time to begin cART, especially for HIV-infected individuals who are long-term nonprogressors, and those uninfected that choose to take the pre-exposure prophylaxis. Studies proposing dietary interventions and/or nutrition education, could also contribute to the reduction of oxidative stress and the consequent persistent inflammation.

References

- 1- UNAIDS. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS. Global AIDS Response Progress Reporting. Available from: <http://www.unaids.org>. Accessed 02 November 2015.
- 2- Ministério da Saúde. Novo Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos. Brazil. 2013. 227 p.
- 3- The INSIGHT START Study Group. Initiation of Antiretroviral Therapy in Early Asymptomatic HIV Infection. *N Engl J Med* **2015**; 373:795-807.
- 4- Ministério da Saúde. Departamento de DST, Aids e hepatites virais. Brazil: Boletim Epidemiologia Dst Aids; 2014. 84 p.
- 5- Guaraldi G, Orlando G, Zona S, Menozzi M, Carli F, Garlassi E, et al. Premature age-related comorbidities among HIV-infected persons compared with the general population. *Clin Infect Dis* **2011**; 53(11):1120-6.
- 6- Hulgán T, Morrow J, D'Aquila RT, Raffanti S, Morgan M, Rebeiro P, et al. Oxidant stress is increased during treatment of human immunodeficiency virus infection. *Clin Infect Dis* **2003**; 37(12):1711–7.
- 7- Ngondi JL, Oben J, Forkah DM, Etame LH, Mbanya D. The effect of different combination therapies on oxidative stress markers in HIV infected patients in Cameroon. *AIDS Res Ther* **2006**; 3:19.
- 8- Kaio DJI, Rondó PHC, Luzia LA, Souza JMP, Firmino AV, Santos SS. Vitamin E Concentrations in Adults with HIV/AIDS on Highly Active Antiretroviral Therapy. *Nutrients* **2014**; 6(9):3641-52.
- 9- DP, Jones. Redefining oxidative stress. *Antioxid.Redox Signal* **2006**; 8(9-10): 1865-79.
- 10- Meng Q, Olivero OA, Fasco MJ, Bellisario R, Kaminsky L, Pass KA, et al. Plasma and cellular markers of 30-Azido-30-dideoxythymidine (AZT) metabolism as indicators of DNA damage in cord blood mononuclear cells from infants receiving prepartum NRTIs. *Environ Mol Mutagen* **2007**; 48(3-4):307-21.
- 11- Nunnari G, Smith JA, Daniel R. HIV-1 Tat and AIDS-associated cancer: targeting the cellular anti-cancer barrier?. *J Exp Clin Cancer Res* **2008**; 27:3.

- 12- Suresh DR, Annam V, Pratibha K, Prasad PV. Total antioxidant capacity – a novel early bio-chemical marker of oxidative stress in HIV infected individuals. *J Biomed Sci* **2009**; 16(61):1423.
- 13- González-Blanco I, Calás-Hechavarria V, Gravier-Hernández R, Pérez-Correa D, Reyes-Pérez A, Hernández-Requejo D, et al. Oxidant/antioxidant status in subjects with HIV infection in different clinical conditions. *Biomed Aging Pathol* **2014**; 4(3):235-42.
- 14- Redhage LA, Shintani A, Haas DW, Emeagwali N, Markovic M, Oboho I, et al. Clinical factors associated with plasma F2-isoprostane levels in HIV-infected adults. *HIV Clin Trials* **2009**; 10(3):181–92.
- 15- Mandas A, Iorio EL, Congiu MG, Balestrieri C, Mereu A, Cau D, et al. Oxidative imbalance in HIV-1 infected patients treated with antiretroviral therapy. *J Biomed Biotechnol* **2009**; 2009:749575.
- 16- Kaio DJ, Rondó PHC, Souza JMP, Firmino AV, Luzia LA, Segurado AA. Vitamin A and beta-carotene concentrations in adults with HIV/AIDS on highly active antiretroviral therapy. *J Nutr Sci Vitaminol* **2013**; 59(6):496–502.
- 17- Morimoto HK, Colado Simão AN, de Almeida ERD, Ueda LT, Oliveira SR, de Oliveira NB, et al. Role of metabolic syndrome and antiretroviral therapy in adiponectin levels and oxidative stress in HIV-1 infected patients. *Nutrition* **2014**; 30(11-12):1324–30.
- 18- Nielsen F, Mikkelsen BB, Nielsen JB, Andersen HR, Grandjean P. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. *Clin Chem* **1997**; 43(7):1209-14.
- 19- Sasaki YF, Kawaguchi S, Kamaya A, Ohshita M, Kabasawa K, Iwama K, et al. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutat Res* **2002**; 519(1-2):103-119.
- 20- Beretta G, et al. Total antioxidant performance: a validated fluorescence assay for the measurement of plasma oxidizability. *Anal Biochem*. 2006;354:290-8.
- 21- Ferreira AL, Matsubara LS. Free radicals: concepts, associated diseases, defense system and oxidative stress. *Rev Assoc Med Bras* **1997**; 43(1):61-8.
- 22- Smith RL, De Boer R, Brui S, Budovskaya Y, van Speck H. Premature and accelerated aging: HIV or HAART? *Front Genet* **2013**; 3:328.
- 23- Jareño EJ, Bosch-Morell F, Fernández-Delgado R, Donat J, Romero FJ. Serum malondialdehyde in HIV seropositive children. *Free Radic Biol Med* **1998**; 24(3):503-6.
- 24- Sönnernborg A1, Carlin G, Akerlund B, Jarstrand C. Increased production of malondialdehyde in patients with HIV infection. *Scand J Infect Dis* **1988**; 20(3):287-90.
- 25- Rosales-Corral R, Tan DX, Manchester L, Reiter RJ. Diabetes and Alzheimer disease, two overlapping pathologies with the same background: oxidative stress. *Oxid Med Cell Longev* **2015**; 2015:985845.

- 26- Crist MB, Melekhin VV, Bian A, Shintani A, Milne JL, Kallianpur AR, et al. Higher serum iron is associated with increased oxidant stress in HIV-infected men. *J Acquir Immune Defic Syndr* **2013**; 64(4):367-73.
- 27- Gupta SK, Slaven JE, Kamendulis LM, Liu Z. A randomized, controlled trial of the effect of rilpivirine versus efavirenz on cardiovascular risk in healthy volunteers. *J Antimicrob Chemother* **2015**; 70(10): 2889–93.
- 28- Shishehbor MH, Zhang R, Medina H, Brennan ML, Brennan DM, Ellis SG, et al. Systemic elevations of free radical oxidation products of arachidonic acid are associated with angiographic evidence of coronary artery disease. *Free Radic Biol Med* **2006**; 41(11):1678-83.
- 29- Montine TJ, Markesbery WR, Morrow JD, Roberts LJ 2nd. Cerebrospinal fluid F2-isoprostane levels are increased in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* **1998**; 44(3):410–13.
- 30- Morrow JD, Frei B, Longmire AW, Gaziano JM, Lynch SM, Shyr Y, et al. Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2- isoprostanes) in smokers. Smoking as a cause of oxidative damage. *N Engl J Med* **1995**; 332(18):1198–203.
- 31- Colado Simao AN, Victorino AJ, Morimoto HK, Reiche EM, Panis C. Redox-driven events in the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection and their clinical implications. *Curr HIV Res* **2015**; 13(2):143-50.
- 32- Nagy G, Ward J, Mosser DD, Koncz A, Gergely P Jr, Stancato C, et al. Regulation of CD4 Expression via Recycling by HRES-1/ RAB4 Controls Susceptibility to HIV Infection. *J Biol Chem* **2006**; 281(45):34574-91.
- 33- Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med* **2006**; 12(12):1365-71.
- 34- Mora JR, Iwata M, von Andrian UH. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. *Nat Rev Immun* **2008**; 8:685-98.
- 35- Niizu PY. Important carotenoids sources for the health. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, Brasil. 2003.
- 36- Baeten JM, McClelland RS, Wener MH, Bankson DD, Lavreys L, Mandaliya K, et al. Relationship between markers of HIV-1 disease progression and serum beta-carotene concentrations in Kenyan women. *Int J STD AIDS* **2007**; 18(3):202–6.
- 37- Bilbis LS, Idowu DB, Saidu Y, Lawal M, Njoku CH. Serum levels of antioxidant vitamins and mineral elements of human immunodeficiency virus positive subjects in Sokoto, Nigeria. *Ann Afr Med* **2010**; 9(4):235-39.
- 38- Aukrust P, Luna L, Ueland T, Johansen RF, Muller F, Froland SS et al. Impaired base excision repair and accumulation of oxidative base lesions in CD4+ T cells of HIV-infected patients. *Blood* **2005**; 105(12):4730-5.

- 39- Paul S, Bogdanov MB, Matson WR, Metakis L, Jacobs J, Beal MF. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a metabolite of oxidized DNA, is not elevated in HIV patients on combination antiretroviral therapy. *Free Radic Res* **2003**; 37(5):499-02.
- 40- Oliveira HM, Damiani AP, Dias RO, Romão PRT, Andrade VM. Effect of antiretroviral drugs on the DNA damage in mice. *Environ Toxicol Pharmacol* **2014**; 37(1):390-5.

Ativação Imune e Estresse Oxidativo em Indivíduos com Infecção Assintomática pelo HIV

Running head: Ativação Imune e Sistema Redox em PVHA

KI Tasca^{1§}, CR Correa², JC Trindade¹, MB Mendes¹, M Gatto¹, VM Manfio¹, M Biasin³ e LR Souza¹.

¹ Departamento de Doenças Tropicais, Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, Brasil.

² Departamento de Patologia, FMB/UNESP, Botucatu, Brasil.

³ Departamento de Ciências Biomédicas e Clínicas, Universidade de Milão, Milão, Itália.

Palavras-chave: HIV/Aids, cART, Estresse Oxidativo, Ativação Imune.

Resumo

Objetivos: Analisar marcadores de ativação imune, inflamação e estresse oxidativo em indivíduos infectados pelo HIV submetidos ou não à cART, e com diferentes respostas imunológicas (adequada ou inadequada), de acordo com as contagens de T CD4+.

Metodologia: Estudo transversal de 92 infectados pelo HIV, assintomáticos, divididos em: G1, 20 virgens de tratamento (VT), T CD4+ <500 células/mm³; G2, 20 VT, T CD4+ >500; G3, 12 VT, T CD4+ >500 e infecção há mais de cinco anos; G4, 20 indivíduos sob cART, carga viral (CV) indetectável e T CD4+ >500 há mais de 5 anos; G5, 20 indivíduos sob cART, CV indetectável e T CD4+ <500 há mais de 5 anos. Marcadores estudados: receptor solúvel de produtos finais de glicação avançada (sRAGE), proteína HMGB1, CD14 solúvel (sCD14), IL-8, IL-10, 8-isoprostano, carotenoides, retinol, α -tocoferol e dano no DNA.

Resultados: G4 apresentou maiores níveis de sRAGE, em comparação ao G1, G2, G3 e, de sCD14, que G1 e G2. Quanto à IL-10, G1>G2>G3>G4>G5. Observaram-se níveis mais elevados de 8-isoprostano no G1. Concentrações de criptoxantina foram maiores no G2 e G3 e a de luteína, mais baixa no G5. G3 apresentou maior dosagem de retinol do que G4 e, menores danos genotóxicos induzidos por estresse oxidativo que os demais grupos. Não houve diferença para os demais marcadores.

Conclusão: Apesar de G4 ter apresentado maior sRAGE, que poderia ser um efeito benéfico da terapia, este grupo mostrou os valores mais altos de sCD14. G4 e G5 mostraram menores dosagens de IL-10 e, concentrações mais baixas de algumas vitaminas, sugerindo que a terapia, apesar de estar relacionada a menor ativação imune e inflamação, altera o perfil vitamínico e, conseqüentemente, aumenta o estresse oxidativo desses pacientes. Além disso, G3 apresentou o menor índice genotóxico que todos os outros grupos, indicando que, tanto a CV quanto cART poderiam ser responsáveis pelo aumento no dano do DNA dos infectados pelo HIV. Níveis elevados de 8-isoprostano no G1 revelaram que, não apenas a cART pode influenciar no aumento do estresse oxidativo, mas também o próprio vírus. Assim, mais estudos são necessários para compreender os mecanismos de persistentes ativação e inflamação, e a influência de cART nestes processos.

Introdução

O HIV infecta vários tipos celulares, principalmente, os linfócitos T CD4+, que quando ativadas produzem novas cópias virais e, eventualmente, morte celular devido a seus efeitos citopáticos [1]. Assim, o principal dano causado pelo vírus é a deterioração progressiva do sistema imune celular, levando a grave imunodepressão, o que torna o indivíduo mais suscetível às doenças oportunistas [2].

Até a década de 1990, as causas de mortes mais frequentes estavam associadas, principalmente, às infecções causadas por *Pneumocystis jirovecii*, *Toxoplasma gondii*, citomegalovírus e micobactérias do complexo *avium-intracellulare*, entre outras [3]. No entanto, com o advento da terapia antirretroviral combinada (cART), a sobrevida desses indivíduos aumentou significativamente, já que ocorre controle da replicação viral e, com isso, há melhora evidente nos parâmetros imunológicos e clínicos [4], além de diminuir as taxas de transmissão do vírus [2,5].

Apesar da eficácia terapêutica, algumas células infectadas latentes mantêm o pró-vírus integrado ao seu DNA, mas sem expressar proteínas virais, conhecidas como “reservatórios” [6]. Essa condição permanece até que a célula seja estimulada e ativada, o que atrasa o combate do sistema imune contra o vírus ou dificulta a ação dos medicamentos antirretrovirais [1,6], que deve ser utilizado por toda a vida do indivíduo infectado.

Sabe-se, ainda, que a existência dos reservatórios virais é um dos fatores que contribuem com a intensa ativação imune [7], o que leva a um *status* inflamatório crônico e, tais mecanismos são desencadeadores de uma série de comorbidades não associadas à aids, como doenças cardiovasculares, hepáticas, ósseas, renais, metabólicas, neoplásicas, entre outras [8-11]. Aliás, estas doenças são, atualmente, as principais causas de morte entre as pessoas que vivem com o HIV/Aids (PVHA) [2].

Além da inflamação persistente causada pelo próprio HIV, ela também está relacionada com o maior estresse oxidativo, um dos efeitos adversos que pode ser induzido pela terapia [12]. É conhecido que as PVHA, especialmente aquelas sob tratamento, apresentam grande desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes [13-15]. Por exemplo, observam-se níveis diminuídos de vitaminas, seus precursores e alguns antioxidantes [16,17] e concentrações elevadas de produtos de peroxidação lipídica, como o 8-isoprostano, na presença de cART. Além disso, toxicidade mitocondrial e dano no DNA, também, são observados nesta população [18,19].

Outro mecanismo que participa da ativação imune e inflamação, é o desequilíbrio homeostático do tecido linfoide associado ao intestino (GALT), que promove ruptura da barreira epitelial e a translocação microbiana para a circulação, aferida pelas dosagens de lipopolissacarídeo (LPS) e CD14 solúvel (sCD14), entre outros marcadores [7,20]. Essa ativação imune, que pode ser desencadeada via *toll like receptors* (TLRs), ativa o fator de transcrição NFκB, que irá transcrever citocinas e outros produtos inflamatórios, tais como, IL-6, IL-8, HMGB1 (*high mobility group box protein-1*) e aumenta a expressão de RAGE (*receptor for advanced glycation end products*) e outros receptores na membrana celular [20-22]. Estudos mostram aumento de mediadores inflamatórios em PVHA [23], mesmo naqueles sob cART, que é responsável pela diminuição apenas parcial do *status* inflamatório. Desta forma, esses estímulos constantes, levam à imunossenescência e ao processo de envelhecimento precoce das PVHA [8,10,12].

Considerando a necessidade de maior entendimento sobre a intensa ativação imune celular, os mecanismos de inflamação persistente e o estresse oxidativo, além da influência deles no desenvolvimento das doenças não associadas à aids, o objetivo do presente estudo foi investigar alguns destes marcadores em diferentes grupos de PVHA, assintomáticos, de acordo com o uso ou não de cART e de suas diferentes contagens de linfócitos T CD4+.

Metodologia

Delineamento do estudo:

Estudo transversal conduzido entre 2012 e 2015, no Serviço de Ambulatórios Especializados em Infectologia “Domingos Alves Meira” (SAEI-DM), do Complexo Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB)- UNESP, interior de São Paulo, Brasil. O Serviço atende cerca de 600 PVHA. Cerca de 250 sujeitos foram convidadas a participar do estudo e, após critérios de exclusão, 92 pacientes participaram da pesquisa. Eles foram divididos em cinco grupos, de acordo com o esquema abaixo:

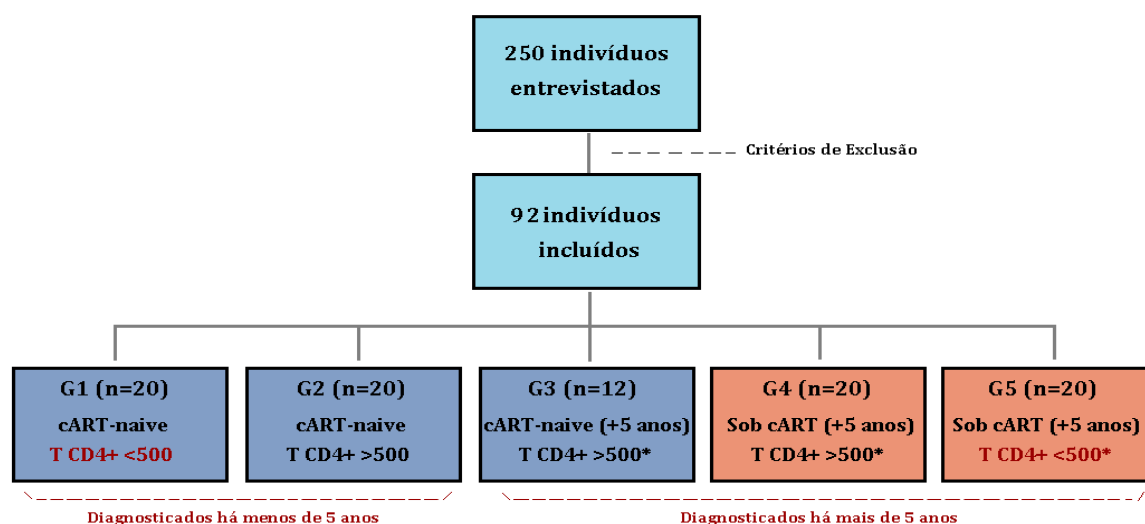


Figura 01. Fluxograma de inclusão e divisão em grupos de estudo, de acordo com o uso ou não de cART, contagem de T CD4+ e tempo do diagnóstico da infecção pelo HIV.

Legenda: cART- terapia antirretroviral combinada; T CD4+- contagem de T CD4+ (células/mm³). *condição observada nos últimos 5 anos.

Critérios de inclusão e exclusão:

Para inclusão, considerou-se: idade mínima de 20 anos e máxima de 50, ser virgem de tratamento ou estar em tratamento há mais de cinco anos, com carga viral (CV) indetectável durante este período e ter adesão confirmada pelo próprio sujeito do estudo e pelos registros de retirada de medicamento na farmácia do Serviço. Todos os incluídos deram seu consentimento por escrito com assinatura no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Os pacientes excluídos foram os que apresentaram alguma das seguintes condições, uso de suplementação vitamínica, história de câncer (atual ou anterior), anorexia, obesidade mórbida, diabetes *mellitus*, doenças cardiovasculares ou autoimunes, transplantes de órgãos, gravidez em qualquer estágio ou lactantes, coinfeções, tais como, tuberculose, hepatites virais crônicas, toxoplasmose cerebral ou disseminada, entre outras; doenças genéticas; usuários de drogas ilícitas e álcool. Para os critérios, a seguir, a exclusão ocorreu apenas quando os pacientes apresentavam, concomitantemente, dois deles ou mais, a saber: realização regular de exercícios físicos intensos; estar em uso de antibióticos, ansiolíticos ou antidepressivos; serem fumantes ativos.

Dados sócio demográficos e clínicos:

Foram coletados dados sócio demográficos e clínicos, a partir de entrevista e acesso aos prontuários médicos.

Realização dos ensaios laboratoriais:

Foram coletados 12 mL de sangue de cada paciente incluído no estudo, em tubo com EDTA. O material foi mantido em ambiente frio e escuro por 2-3 horas. Após, foram separados 60 µL de sangue total destinado ao procedimento Cometa e, em seguida, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 1500rpm. Seis alíquotas de plasma por indivíduo foram armazenadas na temperatura -80°C, até a realização dos testes.

AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO IMUNE:

- *Dosagem da Proteína HGMB1 plasmática:* foi realizado ensaio imunoenzimático (ELISA), do tipo sanduiche, através de kit comercial (*MyBioSource*, item MBS2707497) e de acordo com as especificações do fabricante. A concentração plasmática de HMGB1 foi determinada por espectrofotometria, na leitura de 450 nm. Os resultados foram expressos em pg/mL, utilizando a densidade ótica (DO) da curvas e amostras para o cálculo.
- *Dosagem de sCD14:* foi utilizado kit comercial de ELISA (*R&D quantikine*, item DC-140), seguindo protocolo disponibilizado pelo fabricante. A absorbância foi lida no espectrofotômetro, em comprimento de onda de 450 nm e, à partir das DO da amostra e curva, foram calculados os níveis de sCD14 em pg/mL.
- *Dosagem de sRAGE:* a técnica desenvolvida foi o ELISA sanduíche, conforme instruções do fabricante (*R&D Systems*, item DRG00). A leitura foi realizada imediatamente, em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 450 nm. As DO das amostras e curva foram calculadas e expressas por pg/mL.
- *Dosagem de IL-8 e IL-10 no plasma:* A dosagem de citocinas foi realizada por citometria de fluxo (*FACSCalibur-E34297502374*), pelo kit CBA (*cytometric bead array*) de citocinas inflamatórias, de acordo com o manual de instruções do fabricante (*BD-Becton, Dickinson and Company*, item 551811). Em conjunto com as amostras, foram analisados os padrões contendo concentrações conhecidas de cada citocina, para a curva e leitura com os limites de detecção respectivos. Os resultados foram obtidos em pg/mL, à partir dos *software FCAP arrayTM* (*BD-Becton, Dickinson and Company*).

AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO:

- *Aferição da peroxidação lipídica pela análise plasmática do 8-isoprostano:* a técnica desenvolvida foi o ELISA de competição, conforme instruções do fabricante (*Cayman*,

item 516351). O produto final dessa reação enzimática foi lido a 412 nm em espectrofotômetro e as DO foram calculadas para unidade em pg/mL.

- *Análise do dano no DNA pelo ensaio Cometa em células mononucleares do sangue periférico (PBMC)*: O protocolo utilizado foi proposto por Sasaki *et al.* [24]. As lâminas com agarose e amostra, após condicionadas na solução de lise, foram submetidas a três condições: a situação basal (BAS), sem adição de enzimas e; a aplicação das seguintes enzimas: formanodipirimidina-DNA glicosilase (FPG), que cliva 8-oxi-7-hidroxidesoxiguanosina e outras purinas oxidadas e; endonuclease III ou timina glicol-DNA glicosilase (END) capazes de detectar 14 tipos diferentes de adutos provenientes de pirimidinas oxidadas. Após corrida por eletroforese, as lâminas foram coradas com 100 µl de *Sybr Gold* (Invitrogen - USA). Utilizando microscópio de imunofluorescência conectado a um sistema de análise de imagem (*Comet Assay IV, Perceptive Instruments, Suffolk, Haverhill, UK*), um total de 50 nucleóides foram contados para cada lâmina, e os resultados dos danos foram considerados à partir dos valores de percentagem de DNA migrado, chamado “*tail intensity*”(ti), e dos valores relativos à fração do DNA migrado, multiplicado pelo comprimento da cauda, conhecido como “*tail moment*” (tm).
- *Avaliação de antioxidantes, pelas dosagens de vitaminas plasmáticas*: Os carotenoides (licopeno, luteína, criptoxantina, β-caroteno), retinol e α-tocoferol foram medidos por HPLC, com uma coluna C30 (150x4.6 mm, 3 µm), fluxo de 1 mL/min. e segundo Ferreira *et al.* [25]. O HPLC utilizado foi da *Waters 2996* com detector de 455 nm para carotenoides, 325 nm para retinol e 290 nm para α-tocoferol. Para a quantificação dos cromatogramas foi realizada a comparação entre as relações área da substância pela área do padrão interno, obtidas na análise. Os valores das substâncias da solução padrão foram corrigidos por seus coeficientes de extinção molar, e expressos em µmol/mL.

Análise dos resultados:

A análise estatística foi executada respeitando os pressupostos determinados pelos resultados, características e comportamento das variáveis do estudo. Assim, foram utilizados para as variáveis não-paramétricas, os testes Poisson e Distribuição Gamma e, para as paramétricas, Binomial Negativa e ANOVA seguida de Tukey-Kramer. Correlações de Pearson entre os parâmetros escolhidos também foram realizadas. Todos os cálculos foram

ajustados para idade, sexo e uso de tabaco, prática de atividade física intensa e uso de ansiolíticos e/ou antidepressivos.

Variáveis contínuas foram expressas por média (ME) e desvio padrão (DP) e as categóricas, por frequência e porcentagem (%). As diferenças significativas foram consideradas quando os valores de p eram inferiores ou iguais a 0,05. Todas as análises foram realizadas com auxílio de profissionais do Escritório de Apoio à Pesquisa da Instituição, utilizando o programa SAS for Windows, versão 9.2.

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa local.

Resultados

Entre os participantes, a maioria eram homens (61,96%) com idade de aproximadamente 37 ± 8 anos, brancos (88,04%), heterossexuais (70,65%) e solteiros (66,33%). Eram fumantes ativos, 23,66%, praticavam atividade física intensa, 19,32% e 4,0% faziam uso de ansiolíticos e, ou antidepressivos (Tabela 1). Os grupos foram homogêneos entre si, para todos os fatores acima ($p > 0,05$).

O tempo médio de infecção pelo HIV, considerado a partir do diagnóstico, foi de 7 (± 2) anos. O mais baixo *nadir* de T CD4+ foi observado no G5, seguido pelo G4 e, depois, pelo G1. As médias de T CD4+, T CD8+, CV, tempo de terapia e classes de antirretrovirais utilizadas, estão demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1. Caracterização epidemiológica e clínica dos 92 indivíduos infectados por HIV estudados.

Variáveis	G1 ⁽¹⁾	G2 ⁽²⁾	G3 ⁽³⁾	G4 ⁽⁴⁾	G5 ⁽⁵⁾	<i>p valor</i>
Idade (ME±DP; anos)	34,0 ± 8,3	36,9 ± 9,4	35,8 ± 6,2	39,1 ± 7,1	40,0 ± 7,1	=0,057
Gênero Masculino (n/%)	14 / 70,0%	13 / 65,0%	5 / 41,6%	10 / 50,0%	13 / 65,0%	=0,288
Heterossexuais (n/%)	12 / 60,0%	14 / 70,0%	10 / 83,3%	15 / 75,0%	14 / 70,0%	=0,600
Solteiros (n/%)	14 / 70,0%	13 / 65,0%	7 / 58,3%	11 / 55,0%	15 / 75,0%	=0,695
Tabagistas (n/%)	7 / 35,0%	3 / 15,0%	4 / 33,3%	3 / 15,0%	4 / 20,0%	=0,531
Ativ. Físicas (n/%)	2 / 10,0%	5 / 25,0%	2 / 16,6%	6 / 30,0%	3 / 15,0%	=0,304
Antidepressivos (n/%)	2 / 10,0%	1 / 5,0%	0 / 0,0%	0 / 0,0%	1 / 5,0%	=0,859
T CD4+ (ME±DP; céls)	341,6 ± 121,9* ²⁻⁴	699,3 ± 142,8	862,1 ± 360,1	833,7 ± 212,5	343,3 ± 140,0* ²⁻⁴	<0.001
T CD8+ (ME±DP; céls)	1120,2 ± 903,0	1431,1±739,9* ^{4,5}	1261,3 ± 672,6	899,7 ± 292,6	880,1 ± 579,9	<0.010
Nadir CD4 (ME±DP; céls)	316,5 ± 143,7* ²	568,7 ± 122,9	526,5 ± 244,5	294,4±162,2* ^{1,2}	98,1 ± 92,4* ^{all}	<0.010
CV (ME±DP; cópias RNA)	527 ± 1394* ^{2,3}	67 ± 58	36 ± 79	indetectável	indetectável	<0.001
Diag. HIV (ME±DP; anos)	2,1 ± 1,0* ^{4,5}	1,9 ± 0,8* ^{4,5}	7,6 ± 2,2	14,5 ± 3,9	10,6 ± 4,3	<0.010
Tempo cART(ME±DP;anos)	-	-	-	9,0 ± 4,4	8,3 ± 3,5	na
Regimes IP (n/%)	-	-	-	13 / 32,5%	10 / 25,0%	=0,587
Regimes ITRNN (n/%)	-	-	-	7 / 17,5%	8 / 20,0%	=0,500
Terapia Resgate (n/%)	-	-	-	0 / 0,0%	2 / 5,0%	=0,269

Legenda: cART- terapia antiretroviral combinada; na- não avaliado. ME- média; DP- desvio padrão; n- número de sujeitos; G1- virgem de tratamento com T CD4+ abaixo de 500 células/mm³; G2- virgem de tratamento com T CD4+ acima de 500 células/mm³; G3- virgem de tratamento com T CD4+ acima de 500 células/mm³, com diagnóstico há mais de 5 anos; G4- sob cART, carga viral indetectável e T CD4+ acima de 500 células/mm³ há mais de 5 anos; G5- sob cART, carga viral indetectável e T CD4+ abaixo de 500 células/mm³ há mais de 5 anos; CV- carga viral plasmática do HIV (expressa em cópias [x10³] /mL); T CD4+ e T CD8+ - contagens de células (expresso em número de células/mm³); IP- inibidor de protease; ITRNN- inibidor de transcriptase reversa não análogo de nucleosídeo. *Testes estatísticos:* Binomial Negativa, ANOVA seguido de Tukey Kramer, Poisson e Qui-quadrado; * diferenças estatísticas entre os grupos especificados.

Entre os marcadores estudados, o sRAGE foi maior no G4 ($1798,33 \pm 437,21$ pg/mL) do que nos grupos virgens de tratamento ($1332,44 \pm 505,94$ em G1, $p=0,040$; $1358,67 \pm 758,87$ em G2, $p=0,050$; $1089,32 \pm 600,62$ pg/mL em G3, $p=0,009$). O G4 ($11078,54 \pm 9975,14$ pg/mL) também apresentou os maiores níveis de sCD14, observando-se diferença apenas na comparação com G1 ($6751,66 \pm 1693,36$, $p=0,016$) e G2 ($6903,02 \pm 1819,33$ pg/mL, $p=0,046$). As dosagens da proteína HMGB1 não foram diferentes entre os grupos. Esses dados estão mostrados na Figura 2.

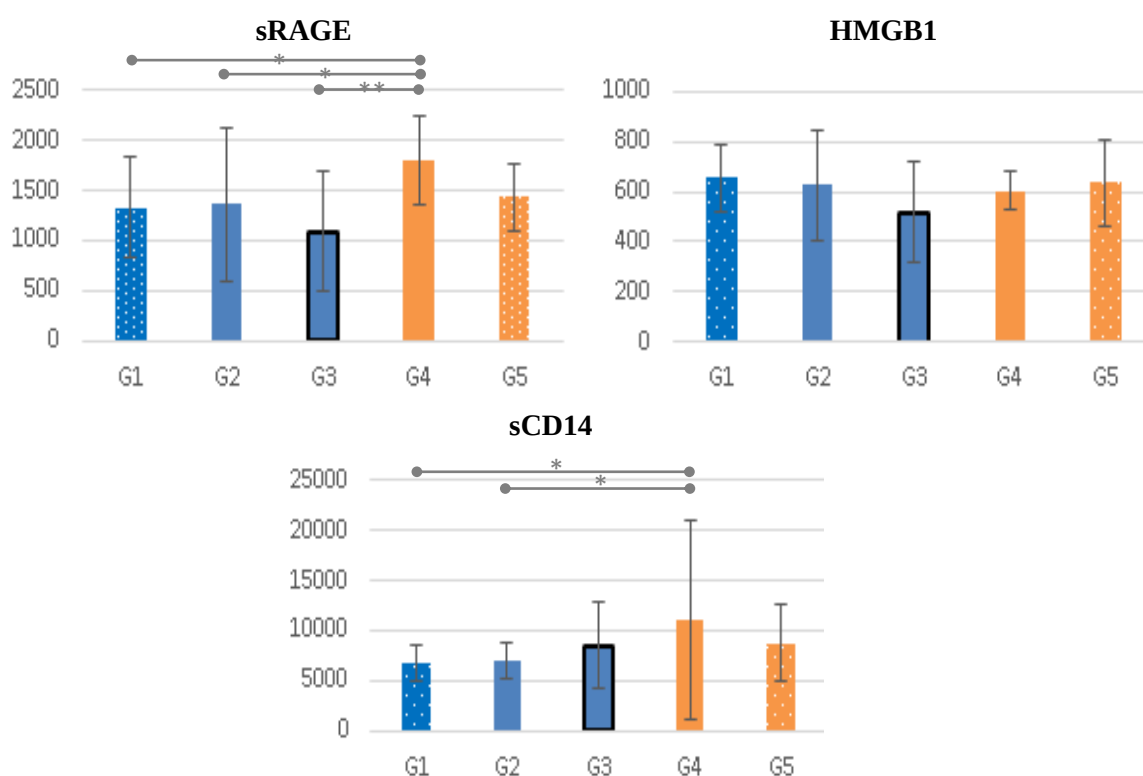


Figura 02. Níveis plasmáticos das proteínas sRAGE, HMGB1 e sCD14 das 92 PVHA, de acordo com os cinco grupos de estudo.

Legenda: PVHA- pessoas que vivem com o HIV/Aids; cART- terapia antirretroviral combinada; G1- virgem de tratamento com T CD4+ abaixo de 500 células/mm³; G2- virgem de tratamento com T CD4+ acima de 500 células/mm³; G3- virgem de tratamento com T CD4+ acima de 500 células/mm³, com diagnóstico há mais de 5 anos; G4- sob cART, carga viral indetectável e T CD4+ acima de 500 células/mm³ há mais de 5 anos; G5- sob cART, carga viral indetectável e T CD4+ abaixo de 500 células/mm³ há mais de 5 anos; sRAGE- receptor solúvel de produtos finais de glicação avançada; HMGB1- high mobility group box1; sCD14- CD14 solúvel. **Testes estatísticos:** Tukey-Kramer para sRAGE e Distribuição Gamma para os demais. * $p<0,05$; ** $p<0,005$.

Quanto às citocinas, não houve diferença para IL-8 entre os grupos, no entanto, para IL-10, os menores valores foram observados nos grupos sob cART, enquanto, as maiores concentrações foram no G1 e G2. As médias de IL-10 foram $0,63 \pm 0,93$ pg/mL

em G1; $0,24 \pm 1,15$ em G2; $0,07 \pm 0,19$ em G3; $0,02 \pm 0,03$ em G4 e $0,01 \pm 0,00$ pg/mL em G5. Houve diferenças na comparação entre os grupos virgens de tratamento e os sob terapia, como mostra a Figura 3.

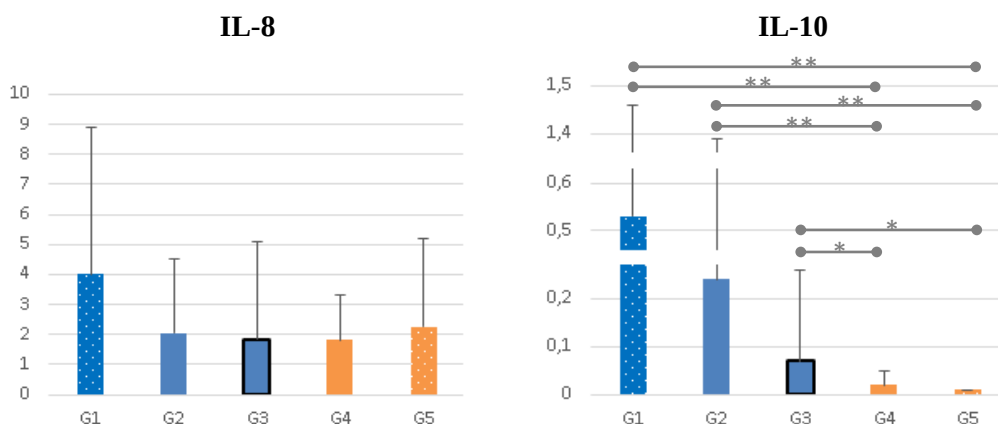


Figura 03. Níveis plasmáticos das citocinas IL-8 e IL-10 das 92 PVHA, de acordo com os cinco grupos de estudo.

Legenda: PVHA- pessoas que vivem com o HIV/Aids; cART- terapia antirretroviral combinada; G1- virgem de tratamento com T CD4+ abaixo de 500 células/mm³; G2- virgem de tratamento com T CD4+ acima de 500 células/mm³; G3- virgem de tratamento com T CD4+ acima de 500 células/mm³, com diagnóstico há mais de 5 anos; G4- sob cART, carga viral indetectável e T CD4+ acima de 500 células/mm³ há mais de 5 anos; G5- sob cART, carga viral indetectável e T CD4+ abaixo de 500 células/mm³ há mais de 5 anos; IL- interlucinas; *Testes estatísticos:* Distribuição Gamma. *p<0,05; **p<0,001.

Alguns parâmetros de estresse oxidativo também foram estudados, entre eles, 8-isoprostano, vitaminas e análise do dano no DNA.

O 8-isoprostano esteve mais elevado no G1, ocorrendo diferença na comparação entre os demais grupos. Como mostra a Figura 4, as médias e desvios padrão do 8-isoprostano foram os seguintes: $64334,88 \pm 12669,83$ para G1; $31855,79 \pm 28720,15$ para G2; $30367,25 \pm 15091,16$ para G3 ($p=0,005$); $32936,75 \pm 18513,95$ para G4 e $40018,33 \pm 25888,53$ para G5 ($p<0,050$).

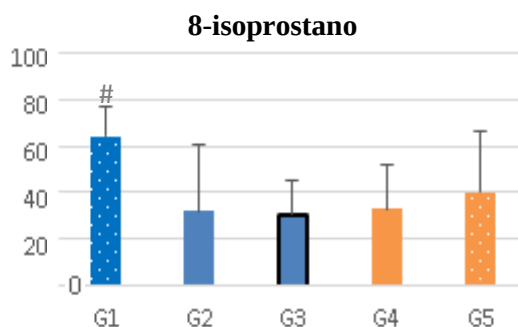


Figura 03. Níveis plasmáticos de 8-isoprostano das 92 PVHA, de acordo com os cinco grupos de estudo.

Legenda: PVHA- pessoas que vivem com o HIV/Aids; cART- terapia antirretroviral combinada; G1- virgem de tratamento com T CD4+ abaixo de 500 células/mm³; G2- virgem de tratamento com T CD4+ acima de 500 células/mm³; G3- virgem de tratamento com T CD4+ acima de 500 células/mm³, com diagnóstico há mais de 5 anos; G4- sob cART, carga viral indetectável e T CD4+ acima de 500 células/mm³ há mais de 5 anos; G5- sob cART, carga viral indetectável e T CD4+ abaixo de 500 células/mm³ há mais de 5 anos; MDA- malondialdeído. *Testes estatísticos:* Distribuição Gamma para 8-iso e Tukey Kramer para MDA. #p<0,05, diferente de todos os outros grupos.

Em relação aos carotenoides estudados, a dosagem de luteína foi menor no G5 ($5,99 \pm 3,12$ $\mu\text{mol/mL}$), do que nos demais grupos (em G1, $11,47 \pm 7,12$, $p=0,006$; em G2, $12,98 \pm 6,66$ $p=0,022$; em G3, $16,08 \pm 9,00$, $p=0,050$ e em G4, $11,76 \pm 6,09$ $\mu\text{mol/mL}$, $p=0,020$). Houve diferença, também, nos valores de criptoxantina, sendo que G2 ($16,45 \pm 6,39$ $\mu\text{mol/mL}$, $p=0,003$) e G3 ($18,73 \pm 8,00$ $\mu\text{mol/mL}$, $p=0,041$) apresentaram níveis mais elevados do que os grupos sob cART (G4, $7,44 \pm 3,88$ e G5, $7,33 \pm 2,04$ $\mu\text{mol/mL}$) e do que G1 ($10,08 \pm 5,55$ $\mu\text{mol/mL}$).

Os grupos não apresentaram diferença entre si, para as dosagens de β -caroteno e licopeno.

Observou-se diferença nas médias do retinol, apenas, entre G3 e G4 ($0,45 \pm 0,10$ e $0,30 \pm 0,10$ $\mu\text{mol/mL}$, respectivamente, $p=0,035$) e não havendo diferença nas dosagens de α -tocoferol entre os grupos, conforme Figura 4.

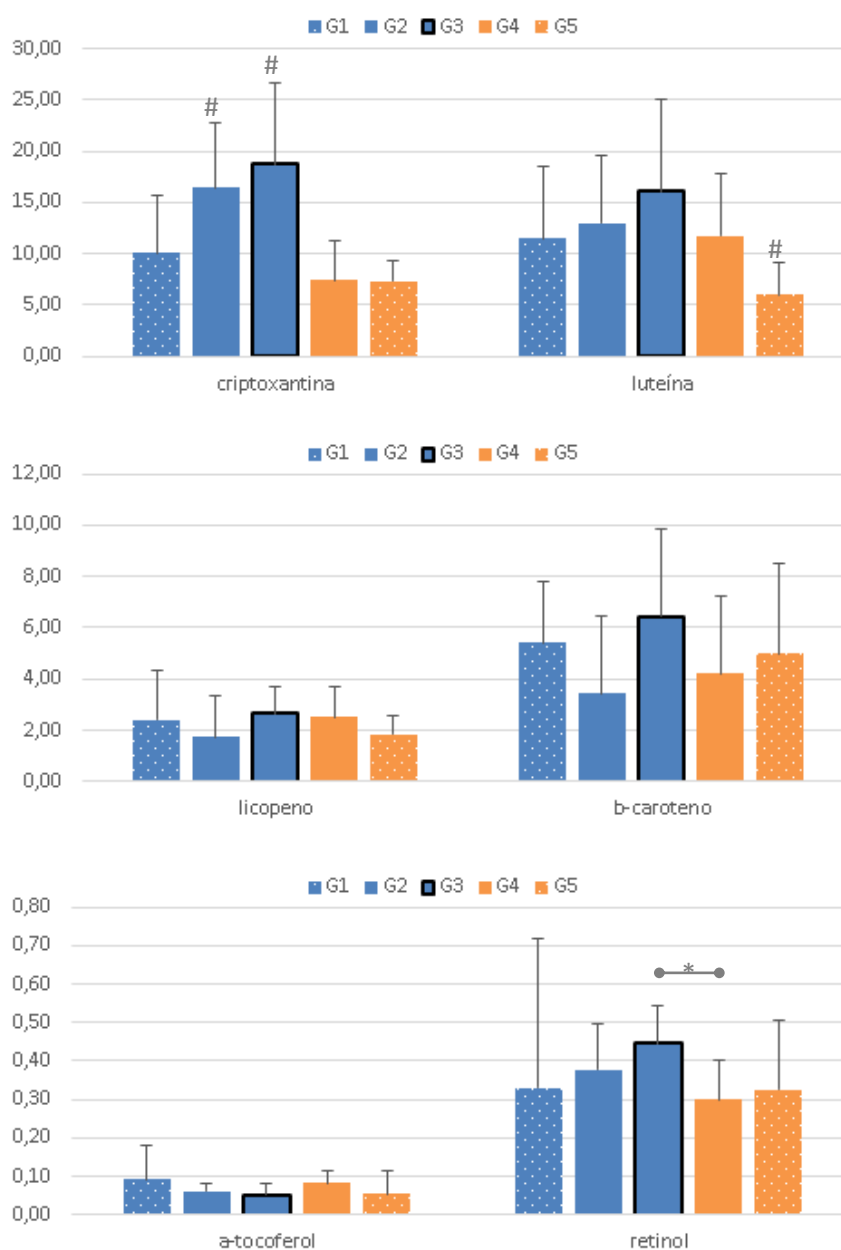


Figura 04. Níveis plasmáticos de carotenoides, retinol e α -tocoferol das 92 PVHA, de acordo com os cinco grupos de estudo.

Legenda: PVHA- pessoas que vivem com o HIV/Aids; cART- terapia antirretroviral combinada; G1- virgem de tratamento com T CD4+ abaixo de 500 células/mm³; G2- virgem de tratamento com T CD4+ acima de 500 células/mm³; G3- virgem de tratamento com T CD4+ acima de 500 células/mm³, com diagnóstico há mais de 5 anos; G4- sob cART, carga viral indetectável e T CD4+ acima de 500 células/mm³ há mais de 5 anos; G5- sob cART, carga viral indetectável e T CD4+ abaixo de 500 células/mm³ há mais de 5 anos. **Testes estatísticos:** Distribuição Gamma. *p<0,05na comparação entre os grupos indicados e; #p<0,05, diferente de todos os outros grupos.

Ao comparar os danos no DNA dos grupos estudados, o G3 ($0,07 \pm 0,02$, *tail moment*) apresentou menores danos do que os demais grupos, considerando as lâminas tratadas com FPG (G1, $0,18 \pm 0,06$, $p=0,033$; G2, $0,12 \pm 0,08$, $p=0,050$; G4, $0,15 \pm 0,02$,

$p=0,041$; e G5, $0,16\pm0,08$, $p=0,035$). Não foram observadas diferenças entre os grupos, para as lâminas sem tratamento (BAS) ou as tratadas com END. Estes dados estão demonstrados na Figura 5 e 6.

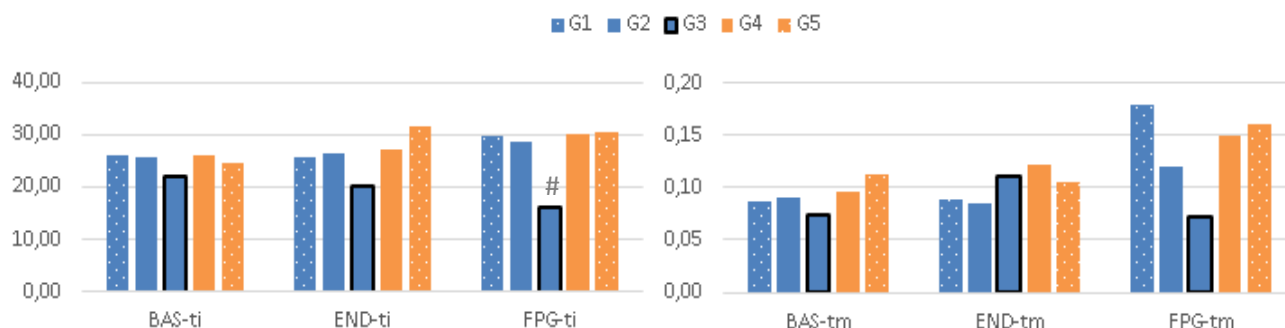


Figura 05. Danos no DNA em PBMC, nas condições, basal (BAS) ou com tratamento enzimático (END e FPG) das 92 PVHA, de acordo com os cinco grupos de estudo.

Legenda: PVHA- pessoas que vivem com o HIV/Aids; cART- terapia antirretroviral combinada; G1- virgem de tratamento com T CD4+ abaixo de 500 células/mm³; G2- virgem de tratamento com T CD4+ acima de 500 células/mm³; G3- virgem de tratamento com T CD4+ acima de 500 células/mm³, com diagnóstico há mais de 5 anos; G4- sob cART, carga viral indetectável e T CD4+ acima de 500 células/mm³ há mais de 5 anos; G5- sob cART, carga viral indetectável e T CD4+ abaixo de 500 células/mm³ há mais de 5 anos. PBMC- células mononucleares do sangue periférico; END- Endonuclease III (tratamento com timidina glicol-DNA glicosilase); FPG- tratamento com formandipirimidina-DNA glicosilase; *Unidade de medida:* tail intensity (ti) e tail moment (tm); *Testes estatísticos:* Distribuição Gamma para BAS-tm, END-tm e FPG-tm e Anova seguido de Tukey Kramer para as demais. # $p<0,05$, diferente de todos os outros grupos.

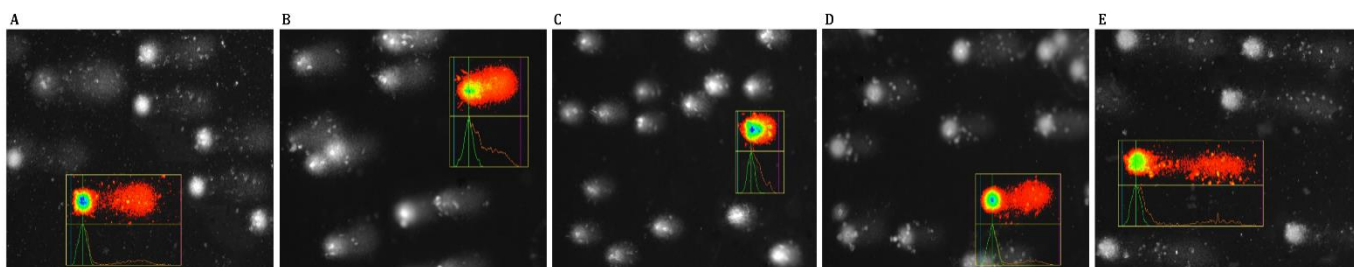


Figura 06. Danos no DNA em cinco PVHA, de acordo com os cinco grupos de estudo, cujas lâminas foram tratadas com a enzima FPG.

Legenda: PVHA- pessoas que vivem com o HIV/Aids; [A] G1- virgem de tratamento com T CD4+ abaixo de 500 células/mm³; [B] G2- virgem de tratamento com T CD4+ acima de 500 células/mm³; [C] G3- virgem de tratamento com T CD4+ acima de 500 células/mm³, com diagnóstico há mais de 5 anos; [D] G4- sob cART, carga viral indetectável e T CD4+ acima de 500 células/mm³ há mais de 5 anos; [E] G5- sob cART, carga viral indetectável e T CD4+ abaixo de 500 células/mm³ há mais de 5 anos. FPG- tratamento com formandipirimidina-DNA glicosilase;

Na análise de Pearson, foram encontradas correlações positivas entre CV e HMGB1 (0,0211) e IL-10 ($p=0,003$). As correlações negativas ocorreram entre T CD4+ e IL-8 ($p=0,027$) e HMGB1 ($p=0,0240$).

Discussão

Considerando a maior expectativa de vida das PVHA nos dias de hoje, tanto processos patogênicos causados pelo HIV quanto o uso prolongado da cART, levam ao desenvolvimento de comorbidades não associadas à aids, que ocorrem de forma mais precoce nesses indivíduos, do que na população geral [10-12]. Caracterizado como envelhecimento precoce, é causado pela constante ativação imune e inflamação crônica, o que leva à exaustão do sistema imune e ao desequilíbrio de citocinas e outros componentes imunológicos e fisiológicos [8,10,12].

Vários receptores e proteínas promovem ativação celular e, consequentemente, a da cascata de sinalização que originará os componentes inflamatórios. O RAGE é um receptor de reconhecimento padrão (PRR), que ativa a célula em que está expresso, devido à sua interação com seus ligantes, por exemplo, AGEs e HMGB1 [26]. A contrário, o sRAGE, sua forma solúvel que é originada por clivagem e liberada para o ambiente extracelular [27] atua como supressor da ativação, pois sequestra os ligantes de RAGE, impedindo, desta forma, a interação entre eles e a posterior sinalização celular [22].

No presente estudo, os níveis de sRAGE foram maiores no grupo sob cART e altas contagens de T CD4+, em relação aos grupos sem cART, o que pode ser explicado sob diferentes pontos de vista. Primeiro, devido ao maior acúmulo de ligantes que poderiam estar presentes na circulação sanguínea desses indivíduos [22], como por exemplo, o sCD14 que, no presente estudo, também foi maior no mesmo grupo. Em segundo lugar, os níveis de sRAGE poderiam ser reflexo da possível diminuição parcial da inflamação, que os pacientes sob cART apresentam [23]. Tal argumento poderia ser justificado, inclusive, pelas menores dosagens de IL-8 encontradas, justamente, no mesmo grupo de pacientes, embora não tenha havido diferença significativa na comparação entre os grupos. Altas concentrações de sRAGE têm sido relacionadas às menores ocorrências de aterosclerose em PVHA [28], hipercolesterolemia [29] e hipertensão arterial [30] em indivíduos não infectados pelo vírus, sugerindo que sua dosagem poderia ser uma ferramenta útil no diagnóstico de doenças cardiovasculares em PVHA [28].

A HMGB1 em sua forma extracelular é uma proteína secretada ativamente pelo estímulo celular ou, passivamente, por células necróticas e apoptóticas e desempenha funções parecidas com as de citocinas pró-inflamatórias [32]. Devido à sua ligação com RAGE e outros PRRs presentes em células CD4+, a HMGB1 pode, inclusive, induzir reativação do HIV [34]. No presente estudo, não houve diferença nas dosagens dessa

proteína entre os cinco grupos. No entanto, a HMGB1 correlacionou-se negativamente com contagens de T CD4⁺ e, positivamente com a CV, o que foi corroborado pelo estudo longitudinal de Trøseid *et al.* [35], que mostrou redução significativa de HMGB1 após introdução da cART.

Youn *et al.* verificaram, ainda, que o estímulo de monócitos com associação de LPS e HMGB1 levou à maior produção de TNF- α , do que o estímulo apenas com LPS [36]. Em conjunto, os achados de Trøseid *et al.* e Youn *et al.* podem indicar que níveis elevados de HMGB1 contribuiriam com pior evolução clínica em infectados pelo HIV, pois haveria, provavelmente, maior ativação celular, reativação do vírus latente e maior produção de citocinas inflamatórias nesses indivíduos. Além disso, elevados níveis plasmáticos de HMGB1 estão relacionados a outras condições inflamatórias crônicas em indivíduos não infectados pelo HIV, incluindo diabetes *mellitus* e câncer [26, 37]. Assim, há necessidade de se investigar a influência de cART na diminuição deste marcador, afim de se postergar a evolução da infecção pelo HIV e o surgimento de comorbidades não associadas à aids.

Entre os marcadores de translocação microbiana, o sCD14, que se relaciona à ativação de monócitos, aparece em maiores concentrações em infectados pelo HIV, quando comparados aos não infectados, além de, também, se associar às comorbidades características do envelhecimento nessa população [39,40,41]. No presente estudo, o grupo de indivíduos em tratamento com altas contagens de T CD4⁺, apresentou maiores níveis de sCD14, em relação aos grupos virgens de tratamento e infecção recente, o que também foi demonstrado por Sandler *et al.* [42]. Este fato poderia estar relacionado ao tempo de infecção e de terapia, pois, apesar da supressão viral em níveis plasmáticos, o GALT é um dos reservatórios virais que pode manter a replicação do HIV [43], num ambiente já deficiente de células T e com pobre função efetora, considerando que a cART não é capaz de restabelecer completamente as células Th17 em GALT [38]. No entanto, no presente estudo, o aumento de sCD14 não ocorreu nos indivíduos sob cART e com T CD4⁺ abaixo de 500 células/mm³, ou seja, nos indivíduos com resposta imunológica não adequada, como seria esperado, pois estes indivíduos teriam, provavelmente, menor quantidade de linfócitos T e resposta imune ainda mais escassa no GALT, o que comprometeria ainda mais o equilíbrio desta mucosa.

Diferente do encontrado no presente estudo, outros autores mostraram relação entre maior translocação microbiana/polimicrobiana em não respondedores imunológicos à cART e a associaram ao desequilíbrio da flora intestinal [44]. A importância de se estudar o marcador sCD14 em PVHA, também se justifica pelas observações de alguns autores de

que houve associação entre sCD14 e o maior risco de doença cardiovascular [46] e de que ele foi preditor de todas as causas de mortalidade em infectados pelo HIV, mesmo naqueles com CV indetectável [42].

Na infecção pelo HIV há desequilíbrio não apenas do perfil Th17, mas também do Th1, Th2 e T regulatório (Treg), sendo que, citocinas inflamatórias estão elevadas nestes pacientes, o que pode influenciar na evolução para aids e desenvolvimento de comorbidades a ela não-associadas [47]. IL-10 é reguladora da resposta imune inflamatória [48]. No presente estudo, esta citocina mostrou diferentes concentrações nos diferentes grupos, cujos níveis mais elevados foram encontrados nos indivíduos virgens de tratamento com infecção recente, níveis intermediários foram observadas em virgens de tratamento diagnosticados há mais de cinco anos e, as mais baixas, nos indivíduos sob cART. Estes resultados concordam com os de Brockman *et al.* [48], que mostraram redução, tanto dos níveis plasmáticos de IL-10 quanto da expressão de seu mRNA, nos indivíduos tratados e com supressão viral adequada, em comparação aos virgens de tratamento, com exceção dos controladores de elite, que apresentaram valores semelhantes aos de indivíduos não infectados pelo HIV, sugerindo que a replicação viral pode ser o principal fator determinante das concentrações desta citocina. Da mesma forma, no presente estudo, também foi encontrada correlação positiva entre CV e níveis de IL-10.

A IL-8, citocina inflamatória investigada no presente estudo, mostrou, apenas, correlação negativa com T CD4+, como observado também por Haissman *et al.* [49], que evidenciou maiores níveis de citocinas inflamatórias em indivíduos com contagens de T CD4+ abaixo de 200 células/mm³. Assim, o monitoramento de citocinas inflamatórias poderia ser incluído no acompanhamento de pacientes, no sentido de se avaliar a evolução da infecção por HIV.

Sabe-se que a presença constante destes componentes inflamatórios e a replicação residual do HIV, induzem o estresse oxidativo nas PVHA, que ocorre quando há superprodução de EROs e ERNs ou a redução na capacidade antioxidante. Tal estresse oxidativo é potencializado pelos efeitos tóxicos da cART [19]. Por exemplo, sabe-se que os IPs desregulam as proteínas UPS (*ubiquitin-proteasome system*) que contribuirão com estresse no retículo endoplasmático, bem como com o acúmulo de lipídeos e aparecimento da resistência à insulina e diabetes *mellitus* e aumento no risco de aterosclerose [50]. Além disso, os IP ativam vias intracelulares de apoptose e aumentam o *status* pró-oxidante do ambiente intracelular [50]. Já os ITRN, inibem a polimerase do DNA, diminuindo o DNA mitocondrial e apresentando perda de sua membrana, menores

taxas respiratórias e fosforilação oxidativa, o que, consequentemente, induz maior produção de EROs e estresse oxidativo [51].

No presente estudo, o 8-isoprostano, um marcador de peroxidação lipídica, esteve mais elevado nos indivíduos virgens de tratamento, com T CD4+ abaixo de 500 células/mm³, que nos demais grupos. Isso pode ser explicado pela associação entre alto estresse oxidativo nos pacientes que apresentam altas CV e sistema imune deficiente. Assim, neste estudo, a cART parece não ter aumentado os níveis deste marcador, ao contrário dos achados de outros estudos, como o de Redhage *et al.* [18] e Hulgán *et al.* [14] em que PVHA sob cART, mesmo aqueles com controle da replicação viral, apresentaram elevados níveis de 8-isoprostano. Estes autores apontaram, ainda, que os indivíduos sob cART sem ITRNN na sua composição, apresentavam índices mais elevados de 8-isoprostano em comparação aos que o utilizavam, ou aos virgens de tratamento. Altos níveis deste marcador são encontrados, também, em várias comorbidades não associadas à aids, entre elas a aterosclerose [53], o que ressalta a necessidade de mais estudos que visem diminuir este parâmetro em PVHA.

Os carotenoides possuem capacidade de capturar radicais livres e, muitos deles são precursores do retinol, ou vitamina A. No sistema imune, o retinol estimula a fagocitose, proliferação de células T, ativação da citotoxicidade mediada por células e a produção de anticorpos, além de auxiliar na homeostase da mucosa do intestino [54,55]. No entanto, estudos mostraram deficiência de β -caroteno e retinol na população infectada pelo HIV [56,57], em comparação à não infectada, o que foi evidente, inclusive, nos indivíduos sob cART [56]. Entre os carotenoides aqui estudados, os grupos não apresentaram diferença entre si, para as dosagens de β -caroteno e licopeno. No entanto, a dosagem de luteína foi menor no grupo sob cART e baixas contagens de T CD4+, o que sugere que, tanto o uso de cART quanto a imunodeficiência poderiam influenciar nos níveis de luteína. A criptoxantina também parece sofrer influência de cART e da resposta imune. Seus níveis foram diferentes entre os grupos do presente estudo, sendo mais elevada nos virgens de tratamento e com altos níveis de T CD4+, em relação aos grupos sob cART e o de virgens de tratamento com resposta imunológica inadequada. Já o retinol, foi maior nos indivíduos sem tratamento há muitos anos, e com altas contagens de T CD4+, evidenciando a importância dos mecanismos naturais de controle da infecção pelo HIV que estes indivíduos apresentam.

O α -tocoferol, é um antioxidante lipossolúvel que atua bloqueando a etapa de propagação da peroxidação lipídica dos ácidos graxos polinsaturados das membranas e

lipoproteínas. Ela também bloqueia a ativação de NFκB e produção de citocinas pró-inflamatórias e têm potencial fisiológico na diminuição da aterosclerose [58]. Não houve diferença nas dosagens de α -tocoferol entre os indivíduos aqui estudados, mas, para outros autores, houve diminuição de vitamina E [59] em indivíduos com baixas contagens de T CD4⁺. Esta discordância de resultados pode estar relacionada aos diferentes delineamentos de estudo e características da população. Apesar de, no presente estudo, não se ter avaliado classes de cART nem porcentagem de deficiência desta vitamina nos participantes, em um estudo brasileiro, deficiência desta vitamina foi encontrada em quase 20% das PVHA, o que ocorreu em maior frequência nos pacientes sob cART e que não utilizavam ITRNN na sua composição [17]. Sabendo da deficiência de antioxidantes nesta população e de sua importância na diminuição do estresse oxidativo, acompanhar as dosagens destes e outros componentes em PVHA poderia auxiliar os profissionais de saúde em intervenções que pudessem melhorar este quadro, como a recomendação de alimentação adequada e possíveis indicações de suplementações de micronutrientes à estes indivíduos.

Em longo prazo, o estresse oxidativo leva a efeitos genotóxicos, que podem, ou ser reparados ou levar a mutagenicidade [60]. Ao comparar os danos no DNA nos grupos aqui estudados, houve menor dano oxidativo nos indivíduos virgens de tratamento, com infecção há mais de cinco anos e contagens de T CD4⁺ superiores a 500 células/mm³. Uma possível explicação é que estes indivíduos, como apresentam bom controle da replicação viral e das contagens de T CD4⁺ sem a presença de cART, podem apresentar, também, mecanismos de reparo mais eficientes de DNA, como aqueles encontrados em progressores lentos [61]. Afinal, é conhecido que, tanto a CV do HIV quanto os antirretrovirais podem contribuir com aumento genotóxico nesses pacientes [14,62,63], o que se observou nos demais grupos estudados da presente pesquisa.

Existem poucos estudos em humanos, sobre a frequência do dano no DNA e suas consequências na infecção pelo HIV e no aparecimento de outras comorbidades, sendo escassos, também, estudos *in vivo* sobre a interferência dos medicamentos disponíveis neste aspecto. Considerando que a instabilidade genômica pode contribuir com o desenvolvimento de neoplasias e que, tais comorbidades são comuns na população infectada pelo HIV nos dias de hoje, seria interessante haver mais estudos que avaliassem a influência do uso crônico da cART, bem como do estímulo persistente de ativação e inflamação nas PVHA, nessas alterações genotóxicas.

Este estudo apresentou algumas limitações, como seu delineamento transversal, número reduzido de indivíduos na composição do G3 e ausência de inquéritos alimentares

ou medidas antropométricas. No entanto, outros fatores foram controlados, como os rigorosos critérios de exclusão, a homogeneidade dos grupos quanto as variáveis sócio demográficas e a análise dos dados ajustada por sexo, idade, uso de tabaco, prática de atividade física intensa e uso de ansiolíticos e/ou antidepressivos.

Por fim, foi possível verificar que os pacientes com cART, supressão virológica há mais de cinco anos e altas contagens de T CD4+ (>500 células/mm³) apresentam maiores níveis de sRAGE e de sCD14 e, este mesmo grupo, juntamente com aquele sob cART e baixas contagens de T CD4+, mostraram menores dosagens de IL-10 e de vitaminas que os indivíduos virgens de tratamento. Este resultado sugere que a cART pode não restabelecer as funções das células em GALT, o que comprometeria a homeostase local e permitiria essa maior translocação microbiana e, conseqüentemente, levaria ao aumento de alguns ligantes solúveis (por exemplo, sRAGE) na tentativa de minimizar a ativação celular intensa, via RAGE ou TLR. Além disso, apesar dos benefícios incontestáveis da cART, ela pode influenciar na defesa antioxidante do organismo, diminuindo consideravelmente algumas vitaminas, o que poderia comprometer o equilíbrio oxidativo, e contribuir com a persistente inflamação nas PVHA.

Este estudo mostrou, também, que concentrações plasmáticas elevadas de 8-isoprostano ocorreram nos indivíduos virgens de tratamento e contagens de T CD4+ inferiores a 500 células/mm³, evidenciando a participação da replicação viral do HIV no aumento do estresse oxidativo. Em relação aos danos no DNA, o grupo de pacientes virgens de tratamento, com contagens de T CD4+ superiores a 500 células/mm³ e diagnóstico há mais de cinco anos, mostrou o menor índice genotóxico que todos os outros grupos, indicando que tanto a CV quanto cART poderiam ser responsáveis pelo aumento no dano do DNA, processo que talvez pudesse ser atenuado por fatores intrínsecos específicos do organismo, como por exemplo, mecanismos de reparo mais eficientes e genes protetores em certos indivíduos.

Mais estudos são necessários para a compreensão dos mecanismos persistentes de ativação e inflamação, influenciados ou não por cART, afim de se garantir maior longevidade e melhor qualidade de vida das PVHA.

Referências

- 1- Alexaki A, Liu Y, Wigdahl B. Cellular reservoirs of HIV-1 and their role in viral persistence. *Curr HIV Res.* 2008; 6(5): 388-400.

- 2- UNAIDS. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS. Global AIDS Response Progress Reporting. Available from: <http://www.unaids.org>. Accessed 02 November 2015.
- 3- Hirschtick RE, Glassroth J, Jordan MC, Wilcosky TC, Wallace JM, Kvale PA, et al. Bacterial Pneumonia in Persons Infected with the Human Immunodeficiency Virus. *N Engl J Med* 1995; 333: 845-851.
- 4- Ministério da Saúde. Novo Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos. Brazil. 2013. 227 p.
- 5- Cohen MS, Chen YQ, McCauley M, Gamble T, Hosseinipour MC, et al. Prevention of HIV-1 Infection with Early Antiretroviral Therapy. *N Engl J Med* 2011; 365: 493-505.
- 6- Pantaleo G, Graziosi C, Butini L, Pizzo PA, Schnittman SN, Kloter DP, et al. Lymphoid organs function as major reservoirs for human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88(21): 9838-9842.
- 7- Appay V, Sauce D. Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. *J Pathol* 2008; 214: 231-241.
- 8- Hsu DC, Sereti I, Ananworanich J. Serious Non-AIDS events: Immunopathogenesis and interventional strategies. *AIDS Res Ther* 2013; 10(1): 29.
- 9- Cowell A, Shenoi SV, Kyriakides TC, Friedland G, Barakat LA. Trends in hospital deaths among human immunodeficiency virus–infected patients during the antiretroviral therapy era, 1995 to 2011. 2015; 10(9): 608-614.
- 10- Onen NF, Overton ET, Seyfried W, Stumm ER, Snell M, Mondy K, Tebas P. Aging and HIV infection: a comparison between older HIV-infected persons and the general population. *HIV Clin Trials* 2010; 11(2): 100-109.
- 11- Deeks SG, Phillips AN. HIV infection, antiretroviral treatment, ageing, and non-AIDS related morbidity. *BMJ* 2009; 338: a3172.
- 12- Reuben L. Smith, Richard de Boer, Stanley Brul, Yelena Budovskaya, Hans van der Spek. Premature and accelerated aging: HIV or HAART? *Front Genet* 2013; 28.
- 13- Ngondi JL, Oben J, Forkah DM, Etame LH, Mbanya D. The effect of different combination therapies on oxidative stress markers in HIV infected patients in Cameroon. *AIDS Res Ther* 2006; 3:19.
- 14- Hulgán T, Morrow J, D'Aquila RT, Raffanti S, Morgan M, Rebeiro P, et al. Oxidant stress is increased during treatment of human immunodeficiency virus infection. *Clin Infect Dis* 2003; 37(12): 1711-1717.
- 15- Mandas A, Iorio EL, Congiu MG, Balestrieri C, Mereu A, Cau D, et al. Oxidative imbalance in HIV-1 infected patients treated with antiretroviral therapy. *J Biomed Biotechnol* 2009; 749575.
- 16- Suresh DR, Annam V, Pratibha K, Prasad PV. Total antioxidant capacity – a novel early bio-chemical marker of oxidative stress in HIV infected individuals. *J Biomed Sci* 2009; 16(61): 1423.

- 17- Kaio DJI, Rondó PHC, Luzia LA, Souza JMP, Firmino AV, Santos SS. Vitamin E Concentrations in Adults with HIV/AIDS on Highly Active Antiretroviral Therapy. *Nutrients* 2014; 6(9): 3641-3652
- 18- Redhage LA, Shintani A, Haas DW, Emeagwali N, Markovic M, Oboho I, et al. Clinical factors associated with plasma F2-isoprostane levels in HIV-infected adults. *HIV Clin Trials* 2009; 10(3): 181-192.
- 19- Blas-García A, Apostolova N, Esplugues JV. Oxidative Stress and Mitochondrial Impairment After Treatment with Anti-HIV Drugs: Clinical Implications. *Curr Pharmac Design* 2011; 17.
- 20- Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med* 2006; 12(12): 1365-1371.
- 21- Youn JH, Oh YJ, Kim ES, Choi JE, Shin JS. High mobility group box 1 protein binding to lipopolysaccharide facilitates transfer of lipopolysaccharide to CD14 and enhances lipopolysaccharide-mediated TNF-alpha production in human monocytes. *J Immunol* 2008; 180(7): 5067-5074.
- 22- Kalea AZ, Schimidt AM, Hudson BI. RAGE: a novel biological and genetic marker for vascular disease. *Clin Sci (Lond)* 2009; 116(8): 621-637.
- 23- French MA, King MS, Tschampa JM, da Silva BA, Landay AL. Serum immune activation markers are persistently increased in patients with HIV infection after 6 years of antiretroviral therapy despite suppression of viral replication and reconstitution of CD4+ T cells. *J Infect Dis* 2009; 200(8): 1212-1215.
- 24- Sasaki YF, Kawaguchi S, Kamaya A, Ohshita M, Kabasawa K, Iwama K, et al. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutat Res* 2002; 519(1-2): 103-119.
- 25- Ferreira AL, Matsubara LS. Free radicals: concepts, associated diseases, defense system and oxidative stress. *Rev Assoc Med Bras* 1997; 43(1): 61-68.
- 26- Sims GP, Rowe DC, Rietdijk ST, Herbst R, Coyle AJ. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annu Rev Immunol* 2010; 28: 367-388.
- 27- Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM. The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J Clin Invest* 2001; 108(7): 949-955.
- 28- Jeong SJ, Kim CO, Song YG, Baek JH, Kim SB, Jin SJ, et al. Low plasma levels of the soluble receptor for advanced glycation end products in HIV-infected patients with subclinical carotid atherosclerosis receiving combined antiretroviral therapy. *Atherosclerosis* 2011; 219(2): 778-783.
- 29- Santilli F, Bucciarelli L, Noto D, Cefalu AB, Davi V, Ferrante E, et al. Decreased plasma soluble RAGE in patients with hypercholesterolemia: effects of statins. *Free Radical Biol Med* 2007; 43(9): 1255-1262.

- 30- Geroldi D, Falcone C, Emanuele E, D'Angelo A, Calcagnino M, Buzzi MP, et al. Decreased plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end-products in patients with essential hypertension. *J Hypertens* 2005; 23(9): 1725-1729.
- 31- Tian J, Avalos AM, Mao SY, Chen B, Senthil K, Wu H, et al. Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat Immunol* 2007; 8(5): 487-496.
- 32- Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 2002; 418: 191-195.
- 33- Gougeon ML, Melki MT, Saïdi H. HMGB1, an alarmin promoting HIV dissemination and latency in dendritic cells. *Cell Death Differ* 2012; 19(1): 96-106.
- 34- Thierry S, Gozlan J, Jaulmes A, Boniface R, Nasreddine N, Strauss F, et al. High-mobility group box 1 protein induces HIV-1 expression from persistently infected cells. *AIDS* 2007; 21(3): 283-292.
- 35- Trøseid M, Sønnerborg A, Nowak P. High mobility group box protein-1 in HIV-1 infection: Connecting microbial translocation, cell death and Immune activation. *Curr HIV Res* 2011; 9(1): 6-10.
- 36- Youn JH, Oh YJ, Kim ES, Choi JE, Shin JS. High mobility group box 1 protein binding to lipopolysaccharide facilitates transfer of lipopolysaccharide to CD14 and enhances lipopolysaccharide-mediated TNF-alpha production in human monocytes. *J Immunol* 2008; 180(7): 5067-5074.
- 37- Zhang S, Zhong J, Yang P, Gong F, Wang CY. HMGB1, an innate alarmin, in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Int J Clin Exp Pathol* 2009; 3(1): 24-38.
- 38- Bixler SL, Mattapallil JJ. Loss and dysregulation of Th17 cells during HIV infection. *Clin Dev Immunol* 2013; 2013: 852418.
- 39- Castley A, Berry C, French M, Fernandez S, Krueger R, Nolan D. Elevated Plasma Soluble CD14 and Skewed CD16+ Monocyte Distribution Persist despite Normalisation of Soluble CD163 and CXCL10 by Effective HIV Therapy: A Changing Paradigm for Routine HIV Laboratory Monitoring? *PLoS ONE* ; 9(12): e115226.
- 40- Schouten J, Wit FW, Stolte IG, Kootstra NA, van der Valk M, Geerlings SE, et al. Cross-sectional Comparison of the Prevalence of Age-Associated Comorbidities and Their Risk Factors Between HIV-Infected and Uninfected Individuals: The AGEHIV Cohort Study. *Clin Infect Dis* 2014; 59(12): 1787-1797
- 41- Klatt NR, Funderburg NT, Brechley JM. Microbial translocation, immune activation and HIV disease. *Trends Microbiol* 2013; 21(1): 6-13.
- 42- Sandler NG, Wand H, Roque A, et al. Plasma levels of soluble CD14 independently predict mortality in HIV infection. *J Infect Dis* 2011; 203(6): 780-790.
- 43- d'Ettorre G, et al. HIV persistence in the gut mucosa of HIV-infected subjects undergoing antiretroviral therapy correlates with immune activation and increased levels of LPS. *Curr HIV Res* 2011; 9: 148-153.

- 44- Merlini E, et al. Evidence for polymicrobial flora translocating in peripheral blood of HIV-infected patients with poor immune response to antiretroviral therapy. *PLoS One* 2011; 6: e18580.
- 45- Justice AC, Freiberg MS, Tracy R, et al. Does an index composed of clinical data reflect effects of inflammation, coagulation, and monocyte activation on mortality among those aging with HIV? *Clin Infect Dis* 2012; 54(7): 984-994.
- 46- Merlini E, Luzi K, Suardi E, Barassi A, Cerrone M, et al. T-cell phenotypes, apoptosis and inflammation in HIV+ patients on virologically effective cART with early atherosclerosis. *PLoS One* 2012; 7: e46073.
- 47- Tasca, KI, Calvi SA, Souza LR. Immunovirological parameters and cytokines in HIV infection. *Rev Soc Bras Med Trop* 2012; 45(6): 663-669.
- 48- Brockman MA, Kwon DS, Tighe DP, Pavlik DF, Rosato PC, Sela J, et al. IL-10 is up-regulated in multiple cell types during viremic HIV infection and reversibly inhibits virus-specific T cells. *Blood* 2009; 9: 114.
- 49- Haissman JM, Vestergaard LS, Sembuche S, Erikstrup C, Mmbando B, Mtullu S, et al. Plasma Cytokine Levels in Tanzanian HIV-1-Infected Adults and the Effect of Antiretroviral Treatment. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2009; 52: 493-497.
- 50- Kathleen MSE, Reyskens M, FaadielEssop. HIV protease inhibitors and onset of cardiovascular diseases: A central role for oxidative stress and desregulation of the ubiquitin–proteasome system. *Bioch Biophys Acta* 2014; 1842: 256-268.
- 51- Nolan D, Mallal S. Complications associated with NRTI therapy: update on clinical features and possible pathogenic mechanisms. *Antivir Ther* 2004; 9.
- 52- ST, Mayne. Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *J Nutr* 2013; 133: 933S-940S.
- 53- Shishehbor MH, Zhang R, Medina H, Brennan ML, Brennan DM, Ellis SG, et al. Systemic elevations of free radical oxidation products of arachidonic acid are associated with angiographic evidence of coronary artery disease. *Free Radic Biol Med* 2006; 41(11): 1678-1683.
- 54- De Souza WA, Da Costa Vilas Boas OM. Vitamin A deficiency in Brazil: an overview. *Rev Panam Salud Publica* 2002; 12: 173-179.
- 55- Mora JR, Iwata M, von Andrian UH. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. *Nat Rev Immun* 2008; 8: 685-698.
- 56- Kaio DJ, Rondó PHC, Souza JMP, Firmino AV, Luzia LA, Segurado AA. Vitamin A and beta-carotene concentrations in adults with HIV/AIDS on highly active antiretroviral therapy. *J Nutr Sci Vitaminol* 2013; 59(6): 496-502.
- 57- Baeten JM, McClelland RS, Wener MH, Bankson DD, Lavreys L, Mandaliya K, et al. Relationship between markers of HIV-1 disease progression and serum beta-carotene concentrations in Kenyan women. *Int J STD AIDS* 2007; 18(3): 202-206.

- 58- Munteanu A, Zingg JM. Cellular, molecular and clinical aspects of vitamin E on atherosclerosis prevention. *Mol Aspects Med* 2007; 28: 538-590.
- 59- Bilbis LS, Idowu DB, Saidu Y, Lawal M, Njoku CH. Serum levels of antioxidant vitamins and mineral elements of human immunodeficiency virus positive subjects in Sokoto, Nigeria. *Ann Afr Med* 2010; 9(4): 235-239.
- 60- Lord CJ, Ashworth A. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature London* 2012; 481(7381): 287-294.
- 61- Peraire J, Miró O, Saumoy M, Domingo P, Pedro E, Villarroya F, et al. HIV-1-Infected Long-Term Non-Progressors have Milder Mitochondrial Impairment and Lower Mitochondrially-Driven Apoptosis in Peripheral Blood Mononuclear Cells than Typical Progressors. *Curr HIV Res* 2007; 5: 467-473.
- 62- Wu KM , Powley MW, Ghantous H. Timing of Carcinogenicity Studies and Predictability of Genotoxicity for Tumorigenicity in Anti-HIV Drug Development. *Inter Jour Toxicol* 2012; 31(3): 211-221.
- 63- Nunnari G, Smith JA, Daniel R. HIV-1 Tat and AIDS-associated cancer: targeting the cellular anti-cancer barrier?. *J Exp Clin Cancer Res* 2008; 27: 3.

Considerações

Finais



Considerações Finais

Vários biomarcadores, entre os inflamatórios, de ativação imune e de estresse oxidativo estão alterados em PVHA, de acordo com suas condições imunológicas e terapêuticas.

- 8 -

Em relação ao estudo longitudinal, foi possível observar que a cART trouxe benefícios aos indivíduos com T CD4+ abaixo de 500 células/mm³; além da redução drástica da CV e elevação nas contagens de T CD4+, ocorreu diminuição nos níveis de AGEs. No entanto, neste mesmo grupo, após o tratamento as concentrações de 8-isoprostano aumentaram e as da capacidade antioxidante total e de algumas vitaminas diminuíram significativamente.

Estes últimos marcadores também foram encontrados diminuídos pós-terapia, no grupo de pacientes que iniciaram o tratamento com contagens de T CD4+ acima de 500 células/mm³. Além disso, este mesmo grupo mostrou maior dano genotóxico induzido por estresse oxidativo após a intervenção terapêutica. Outro aspecto negativo foi o aumento de triglicérides e PCR já nos primeiros meses da cART, em ambos os grupos.

Tais resultados indicam que a cART pode aumentar consideravelmente o estresse oxidativo na maior parte dos indivíduos com infecção assintomática pelo HIV e que ainda não apresentam comorbidades não associadas à aids. Além disso, essa elevação foi ainda mais evidente naqueles que apresentavam contagens de T CD4+ acima de 500 células/mm³ no pré-tratamento.

- 8 -

No estudo transversal foi possível verificar que os pacientes sob cART, supressão virológica há mais de cinco anos e altas contagens de T CD4+ (>500 células/mm³) apresentaram níveis mais altos de sRAGE e de sCD14 e, este mesmo grupo, juntamente com aquele sob cART e contagens de T CD4+ menores do que 500 células/mm³, mostraram dosagens mais baixas de IL-10 e de algumas vitaminas do que os indivíduos virgens de tratamento.

Observou-se, também, que concentrações plasmáticas elevadas de 8-isoprostano ocorreram nos indivíduos virgens de tratamento e contagens de T CD4+ inferiores a 500 células/mm³. Já na análise dos danos no DNA, o grupo sem tratamento, com contagens de

T CD4⁺ superiores a 500 células/mm³ e diagnóstico há mais de cinco anos, mostrou o menor índice genotóxico em comparação aos demais grupos

Estes dados indicam que, tanto o HIV quanto a cART poderiam estar relacionados ao aumento do estresse oxidativo, contribuindo com o *status* inflamatório crônico das PVHA.

- 8 -

Desta forma, os resultados encontrados nos estudos longitudinal e transversal, principalmente em relação aos marcadores AGE, capacidade antioxidante total, 8-isoprostanos, perfil de vitaminas e danos genotóxicos, talvez possam contribuir com mais discussões sobre o início precoce ou tardio de cART em PVHA VT com T CD4>500.

No entanto, considerando o início cada vez mais precoce da cART, seu uso prolongado, o aumento da prevalência e o desenvolvimento precoce de doenças não-associadas à aids, são necessários estudos com maior casuística, sobre estes e outros marcadores e os possíveis mecanismos desencadeadores do estresse oxidativo e inflamatório crônico nestes indivíduos.

Há necessidade, também, de maior investigação sobre intervenções que pudessem modular os sistemas redox, de ativação imune e inflamação, diminuindo a exacerbação e cronicidade destas respostas, além de estratégias para o incentivo de adoção de hábitos saudáveis, afim de se garantir maior longevidade e melhor qualidade de vida às PVHA.

Anexos



Anexos

I – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estudo transversal:

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) PARA PARTICIPAÇÃO EM TRABALHO CIENTÍFICO

Tendo sido convidado e, satisfatoriamente informado sobre o estudo “**Marcadores de Inflamação Crônica e Estresse Celular e Oxidativo em Aids: A Busca do Melhor Prognóstico**”, que tem por objetivo analisar varias proteínas do sistema imunológico, o estado inflamatório e a relação com parâmetros clínicos, laboratoriais e medicamentoso dos indivíduos soropositivos para o HIV e são atendidos no Serviço de Ambulatórios Especializados de Infectologia “Domingos Alves Meira”, FMB/UNESP, eu, _____, **concordo** em participar do mesmo, respondendo às questões da entrevista por tempo estimado de 10 minutos e submetendo-me a exame de coleta de amostra de 20 mL de sangue, em um único momento, para realização de exames laboratoriais, afim de contribuir com a pesquisa. Tenho ciência que esse material colhido poderá ser reutilizado em futuros estudos, depois de aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e sob novo TCLE e, que esta pesquisa é de responsabilidade da doutoranda Karen Ingrid Tasca, sob orientação da Profª Drª Lenice do Rosário de Souza, do Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem. Fui informado que as informações serão utilizadas, exclusivamente, pelas pesquisadoras, que manterão sigilo sobre minha identidade, e que as mesmas estarão disponíveis para responder a quaisquer perguntas. Sei também que **posso retirar este consentimento a qualquer hora sem prejuízo do meu atendimento neste Hospital**. Em caso de dúvida adicional, poderei entrar em contato com o CEP da FMB/UNESP, através dos telefones: (14) 3880-1608 ou 3880-1609.

Este documento foi aprovado pelo CEP, com protocolo de nº4101-2011 e é elaborado em 02 vias, sendo uma entregue ao sujeito da pesquisa e outra mantida em arquivo pelo pesquisador.

Botucatu, _____ de _____ de 20 ____

Assinatura do Sujeito da Pesquisa

MSc. Karen Ingrid Tasca – Bióloga UNESP/FEIS



Lenice do Rosário de Souza;
End: Rua Salim Kahil, 150, Vila Nogueira, Botucatu
Tel: 14 38821395; E-mail: lsouza@fmb.unesp.br

Karen Ingrid Tasca
End: R. Dr Jose B Barros, 105, Jd Paraíso, Botucatu
Tel: 119 9739-9405; Email: karenitasca@yahoo.com.br

I – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estudo longitudinal:

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) PARA PARTICIPAÇÃO EM TRABALHO CIENTÍFICO

Tendo sido convidado e, satisfatoriamente informado sobre o estudo **“Uso de Marcadores de Estresse Celular, Oxidativo e Inflamatório na Indicação Precoce e Tardia de Terapia Antirretroviral em Indivíduos Portadores de HIV”**, que tem por objetivo analisar varias proteínas do sistema imunológico, o estado inflamatório e a relação com parâmetros clínicos, laboratoriais e medicamentoso dos indivíduos soropositivos para o HIV e são atendidos no Serviço de Ambulatórios Especializados de Infectologia “Domingos Alves Meira”, FMB/UNESP, eu, _____, **concordo** em participar do mesmo, respondendo às questões da entrevista por tempo estimado de 10 minutos e submetendo-me a exame de coleta de amostra de 20 mL de sangue, em 2 momentos (intervalo de cerca de 6 meses a 1 ano entre as coletas) para realização de exames laboratoriais, afim de contribuir com a pesquisa. Tenho ciência que esse material colhido poderá ser reutilizado em futuros estudos, depois de aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e sob novo TCLE e, que esta pesquisa é de responsabilidade da doutoranda Karen Ingrid Tasca, sob orientação da Profª Drª Lenice do Rosário de Souza, do Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem. Fui informado que as informações serão utilizadas, exclusivamente, pelas pesquisadoras, que manterão sigilo sobre minha identidade, e que as mesmas estarão disponíveis para responder a quaisquer perguntas. Sei também que **posso retirar este consentimento a qualquer hora sem prejuízo do meu atendimento neste Hospital**. Em caso de dúvida adicional, poderei entrar em contato com o CEP da FMB/UNESP, através dos telefones: (14) 3880-1608 ou 3880-1609.

Este documento foi aprovado pelo CEP, com protocolo de nº4327-2012 e é elaborado em 02 vias, sendo uma entregue ao sujeito da pesquisa e outra mantida em arquivo pelo pesquisador.

Botucatu, _____ de _____ de 20 ____

Assinatura do Sujeito da Pesquisa

MSc. Karen Ingrid Tasca – Bióloga UNESP/FEIS



Lenice do Rosário de Souza;
End: Rua Salim Kahil, 150, Vila Nogueira, Botucatu
Tel: 14 38821395; E-mail: lsouza@fmb.unesp.br

Karen Ingrid Tasca
End: R. Dr Jose B Barros, 105, Jd Paraíso, Botucatu
Tel: 119 9739-9405; Email: karenitasca@yahoo.com.br

II – FICHA DA ENTREVISTA

FICHA DO VOLUNTÁRIO			
<i>Estudo Aprovado pelo CEP/FMB</i>			
Paciente do SAE/HDia-UNESP N° _____			
Registro n°: _____		Data: ____/____/20____	
 DADOS SOCIODEMOGRÁFICOS			
Nome: _____		Sexo: M ☐ F ☐	
Data de Nascimento: ____/____/____		Id: ____ Escolaridade: _____	
Profissão: _____		Estado Civil: _____ Opção Sexual: _____	
Tipo de Documento: RG ☐ CPF ☐ OUTRO ☐ N°: _____			
Endereço: _____			
Cidade: _____		Telefone: _____	
Como contraiu? Diagnóstico? _____		Usa Preservativo nas RS? _____	
Familiar/Amigos sabem da sua Condição Viroológica? _____			
 INCLUSÃO/EXCLUSÃO/OUTROS			
Atualmente é Gestante/Lactante?	<u>Não</u> ☐	Sim ☐	
É Transplantado?	<u>Não</u> ☐	Sim ☐	
Pratica EF regularmente (+3x/sem)? Lev,Mod,Int.	Não ☐	Sim ☐	intensidade: _____
Anorexia ou Obesidade Mórbida?	<u>Não</u> ☐	Sim ☐	peso/altura: _____
Uso de Alcool? Nun,Espor(1x/s),Freq(3x/s),Semp(diário)	<u>Não</u> ☐	Sim ☐	intensidade: _____
Fumante Ativo Cigarro? N°cigarros diários/Tempo uso	<u>Não</u> ☐	Sim ☐	intensidade: _____
Uso Drogas Ilícitas? Qual? Freq?	<u>Não</u> ☐	Sim ☐	_____
Tratamento com TARV? Qual?	Não ☐	Sim ☐	_____
Tem adesão? Porque?	Não ☐	Sim ☐	_____
Tto Ansiolítico ou Antidepressivo? Qual?	<u>Não</u> ☐	Sim ☐	_____
Uso de algum Outro Medicamento Diário?	Não ☐	Sim ☐	supl.vitam.??? _____
Tem ou Teve Câncer?	<u>Não</u> ☐	Sim ☐	_____
Tem Diabetes <i>Mellitus</i> ?	<u>Não</u> ☐	Sim ☐	_____
Possui Doenças CV/HAS?	<u>Não</u> ☐	Sim ☐	_____
Possui Doenças Autoimunes?	<u>Não</u> ☐	Sim ☐	_____
Possui alguma Doença Genética?	Não ☐	Sim ☐	_____
Possui alguma Co-Infecção no Momento?	Não ☐	Sim ☐	_____

III – APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Estudo transversal:



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
e-mail coordenadoria: tsarden@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde
em 30 de abril de 1997

Botucatu, 05 de dezembro de 2011.

Of. 563/2011

Ilustríssima Senhora
Prof^a. Dr^a. Lenice do Rosário de Souza
Departamento de Doenças Tropicais e Diag. Por Imagem da
Faculdade de Medicina de Botucatu

Prezada Prof^a. Lenice,

Informo que o Projeto de Pesquisa: **(Protocolo CEP 4101-2011)**
Marcadores de inflamação crônica e estresse celular e oxidativo em
aids: A busca do melhor prognóstico, a ser conduzido por Karen Ingrid
Tasca, orientada por Vossa Senhoria, com a colaboração de Alexandrina
Sartori e Sueli Aparecida Calvi recebeu do relator parecer favorável,
aprovado em reunião de 05/12/2011.

Situação do Projeto: **APROVADO**. Os pesquisadores deverão apresentar ao
CEP ao final da execução do Projeto o **"Relatório Final de Atividades"**.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Trajano Sardenberg
Coordenador do CEP

III – APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Estudo longitudinal:

 Universidade Estadual Paulista Faculdade de Medicina de Botucatu Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P. CEP: 18.618-970 Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143 e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br e-mail coordenadoria: tsarden@fmb.unesp.br		 Registrado no Ministério da Saúde em 30 de abril de 1997
---	---	--

Botucatu, 03 de setembro de 2012 Of. 425/2012

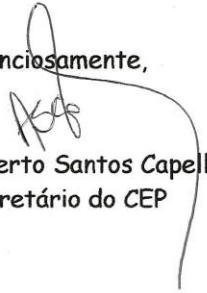
Ilustríssima Senhora
Prof^a. Dr^a. Lenice do Rosário de Souza
Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por
Imagem da Faculdade de Medicina de Botucatu

Prezada Dr^a Lenice,

De ordem do Senhor Coordenador, informo que o Projeto de Pesquisa, (Protocolo CEP 4327-2012) "Uso de marcadores de estresse celular, oxidativo e inflamatório na indicação precoce ou tardia de terapia antirretroviral em indivíduos portadores de HIV", a ser conduzido por Karen Ingrid Tasca, orientada por Vossa Senhoria, com a colaboração da Prof^a Dr^a Alexandrina Sartori, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 03/09/2012.

Situação do Projeto: **APROVADO**. Os pesquisadores deverão apresentar ao CEP ao final da execução do Projeto o "Relatório Final de Atividades".

Atenciosamente,



Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP

IV – ALTERAÇÃO DE TÍTULO DE PROJETO DE PESQUISA, NÍVEL DOUTORADO



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



MUDANÇA DE TÍTULO EM PROJETO DE PESQUISA

Objetivo Acadêmico:

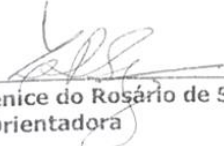
() Pós Doutorado
 (X) Tese Doutorado
 () Dissertação de Mestrado
 () Trabalho científico
 () Outros: Especificar

Título Inicial:
 Marcadores de Inflamação Crônica e Estresse Celular e Oxidativo em Aids:
 a Busca do Melhor Prognóstico

Título Final:
 Marcadores de Ativação Imune, Inflamação Crônica e Estresse Oxidativo
 em Pessoas que Vivem com o HIV/Aids: a Busca do Melhor Prognóstico.

Data da reunião do CEP que aprovou o parecer inicial: 05/12/2011.

Declaro que o trabalho não sofreu alterações nos objetivos e/ou conteúdo metodológico da época de apresentação para análise do CEP.



Profa Adjunta Lenice do Rosário de Souza
 Orientadora



Karen Ingrid Tasca
 Orientada

- *Projetos submetidos via Plataforma Brasil: Preencher o formulário, digitalizar, protocolar no CEP e postar no sistema Plataforma Brasil.*
- *Projetos submetidos anteriormente à Plataforma Brasil: Preencher o formulário em duas vias e protocolar no CEP que emitiu o parecer inicial de aprovação.*

Faculdade de Medicina de Botucatu – Seção Técnica de Pós-graduação
 Distrito de Rubião Júnior, s/n CEP 18618-970 Botucatu São Paulo Brasil
 Tel 55 14 3880 1123 - spg@fmb.unesp.br

14:46 07/01/2016 0000000 COMITE DE ETICA EM PESQUISA FMB - UNESP

