



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

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ASCORBATO E  $\alpha$ -TOCOFEROL EM  
PACIENTES INFECTADOS PELO HIV

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmácia, com ênfase em Análises Clínicas, na Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC.  
Orientador: Prof. Dr. Celso Spada

GIOVANA LÓTICI BAGGIO

Florianópolis  
2005



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

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ASCORBATO E  $\alpha$ -TOCOFEROL EM  
PACIENTES INFECTADOS PELO HIV

GIOVANA LÓTICI BAGGIO

Florianópolis

2005

## ***FICHA CATALOGRÁFICA***

B144e Baggio, Giovana Lótici

Efeito da suplementação com ascorbato e  $\alpha$ -tocoferol em pacientes infectados pelo HIV / Giovana Lótici Baggio ; orientador Celso Spada. – Florianópolis, 2005. 121f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, 2005.

Inclui bibliografia

1. HIV (Vírus). 2. AIDS (Doença). 3. Ascorbato. 4. Alfa-tocoferol. 5. Apoptose. 6. Antioxidantes. 7. Viabilidade celular. I. Spada, Celso. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

CDU: 615.12

*Catálogo na fonte por: Onélia Silva Guimarães CRB-14/071*

A João Fernando, pela compreensão e apoio.

Ao Prof. Dr. Celso Spada pela oportunidade concedida, confiança depositada e empenho em orientar-me.

A CAPES, pela bolsa de estudos concedida durante o Mestrado.

Ao médico Júlio Cesar Verdi, pela triagem e acompanhamento clínico dos pacientes, parceria indispensável para a realização deste trabalho.

A equipe do Ambulatório de DST/AIDS de Florianópolis, Jane, Márcia, Rita, Vera e Ivete, pelo companheirismo e amizade.

Aos pacientes que consentiram em participar deste trabalho, sem os quais o mesmo não seria realizado.

A equipe do Laboratório Médico Santa Luzia, por viabilizar o uso do citômetro de fluxo.

Aos funcionários do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário, pela viabilização das análises realizadas neste trabalho.

A Prof. Dr<sup>a</sup>. Tânia Beatriz Creczinski-Pasa, do Laboratório de Bioenergética e Bioquímica de Macromoléculas, por viabilizar a realização da cultura celular.

Ao Prof. Dr. Manuel de Oliveira Lino, pela dedicação e orientação na realização da análise estatística.

Aos colegas e todos que comigo conviveram, pelo auxílio e amizade.

Obrigada.

*“Ninguém pode construir em teu lugar as  
pontes que precisarás passar para  
atravessar o rio da vida - ninguém, exceto  
tu, só tu.”*

**Friedrich Wilhelm Nietzsche**

## Resumo

### **EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ASCORBATO E $\alpha$ -TOCOFEROL EM PACIENTES INFECTADOS PELO HIV**

Os pacientes infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) apresentam diminuição dos níveis séricos de antioxidantes e aumento simultâneo na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), caracterizando um estado crônico de estresse oxidativo. A ativação imune crônica que ocorre desde os estágios iniciais da infecção é responsável pelo aumento da produção das EROs, que favorecem a replicação viral através da ativação de fatores de transcrição, como NF- $\kappa$ B e AP-1, e a depleção dos linfócitos por apoptose. Os elevados níveis de apoptose verificados nesses pacientes são responsáveis pelo comprometimento do sistema imune e progressão para AIDS. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação com 800 mg/dia de  $\alpha$ -tocoferol e 2.000 mg/dia de ascorbato sobre a viabilidade celular e a evolução da infecção pelo HIV em pacientes submetidos à terapia antirretroviral, através da avaliação de marcadores laboratoriais. Participaram deste estudo 47 voluntários soropositivos para o HIV, destes, 13 foram suplementados com ascorbato, 14 com  $\alpha$ -tocoferol e 20 fizeram uso de placebo. As análises laboratoriais foram realizadas antes do início do tratamento e após 60, 120 e 180 dias. Os resultados obtidos demonstraram o efeito adicional da suplementação sobre o aumento dos níveis de viabilidade celular ( $p=0,002$ ) e diminuição dos níveis de apoptose ( $p=0,0001$ ), independentes da terapia antirretroviral. Os níveis séricos de IgA apresentaram diminuição no grupo suplementado com  $\alpha$ -tocoferol, no entanto não houve diferença estatística ( $p=0,490$ ). Da mesma forma, houve uma tendência de melhores resultados dos níveis séricos de IgM no grupo suplementado com ascorbato ( $p=0,511$ ). Para os marcadores CD4, CD8, relação CD4/CD8 e níveis plasmáticos de RNA do HIV, não observamos efeito adicional da suplementação com ascorbato ou  $\alpha$ -tocoferol. A partir desses resultados concluímos que a suplementação com ascorbato e  $\alpha$ -tocoferol constituem uma ferramenta importante na manutenção da viabilidade celular e recuperação do sistema imune em pacientes infectados pelo HIV.

Palavras chave: HIV, AIDS, ascorbato,  $\alpha$ -tocoferol, apoptose, viabilidade celular

## Abstract

### EFFECTS OF ASCORBATE AND $\alpha$ -TOCOPHEROL SUPPLEMENTATION IN HIV INFECTED PATIENTS

Low serum antioxidant levels are largely seen in HIV infected patients, accompanied by a simultaneous overproduction of reactive oxygen intermediates, characterizing a chronic state of oxidative stress. The chronic immune activation that occurs since the initial stages of the infection is responsible for the increase in the production of reactive oxygen intermediates, which favor viral replication through activation of nuclear transcription factors, like NF- $\kappa$ B and AP-1, which are obligatory for HIV transcription, and depletion of lymphocytes by apoptosis. The high levels of apoptosis observed in these patients are responsible for the commitment of the immune system and progression to AIDS. The aim of this study was to evaluate the effect of 800 mg/day of  $\alpha$ -tocopherol and 2.000 mg/day of ascorbate supplementation on cell viability and the progression of HIV infection in patients under antiretroviral therapy, through the evaluation of prognostic markers. 47 HIV seropositive patients participated in the study, of whom 13 were supplemented with ascorbate, 14 with  $\alpha$ -tocopherol and 20 utilized placebo. The analyses were carried out before the treatment commenced and after 60, 120 and 180 days. The results demonstrate the additional effect of vitamin supplementation in increasing cellular viability ( $p=0,002$ ) and decreasing apoptosis ( $p=0,0001$ ), this effect being independent of antirretroviral therapy. The serological levels of IgA decreased on  $\alpha$ -tocopherol supplemented group, without, however, statistical difference ( $p=0,490$ ). Similar trends were observed on the group supplemented with ascorbate, where serum IgM levels were diminished, but with a lack of statistical significance ( $p=0,511$ ). The results don't demonstrate an additional effect of ascorbate or  $\alpha$ -tocopherol supplementation on CD4 and CD8 cell-count, CD4/CD8 ratio and viral load. Considering these results, we conclude that ascorbate and  $\alpha$ -tocopherol supplementation is an important tool in the maintenance of cellular viability and consequently the recovery of immune system in HIV infected patients.

Keywords: HIV, AIDS, ascorbate,  $\alpha$ -tocopherol, apoptosis, cellular viability

## Índice de Figuras

Figura 1: Ciclo de vida do vírus HIV-1.....	23
Figura 2. Curso típico da doença pelo HIV-1, antes e depois da terapia antirretroviral. ....	26
Figura 3: Vias de apoptose utilizadas pelo HIV.....	37
Figura 4: Seleção das células mononucleares no programa CELLQuest pelo tamanho e granulosidade.....	55
Figura 5: Visualização das três populações celulares de acordo com a emissão de fluorescência no programa CELLQuest.....	55
Figura 6: Visualização gráfica das células viáveis, mortas e em apoptose através do programa PAINT-A-GATE.....	56
Figura 7: Resultado final da avaliação da viabilidade celular de linfócitos.....	56
Figura 8. Linfócitos CD4 (células/mm <sup>3</sup> ) nos tempos 0, 60, 120 e 180 dias após o início do tratamento, nos grupos controle e suplementados.....	62
Figura 9. Linfócitos CD8 (células/mm <sup>3</sup> ) nos tempos 0, 60, 120 e 180 dias após o início do tratamento, nos grupos controle e suplementados.....	63
Figura 10. Relação CD4/CD8 nos tempos 0, 60, 120 e 180 dias após o início do tratamento, nos grupos controle e suplementados.....	64
Figura 11. Linfócitos viáveis (%) nos tempos 0, 60, 120 e 180 dias após o início do tratamento, nos grupos controle e suplementados.....	65
Figura 12. Linfócitos em apoptose (%) nos tempos 0, 60, 120 e 180 dias após o início do tratamento, nos grupos controle e suplementados.....	66
Figura 13. Linfócitos inviáveis (%) nos tempos 0, 60, 120 e 180 dias após o início do tratamento, nos grupos controle e suplementados.....	67
Figura 14. Níveis séricos de IgA (mg/dl) nos tempos 0, 60, 120 e 180 dias após o início do tratamento, nos grupos controle e suplementados.....	68

Figura 15. Níveis séricos de IgG (mg/dl) nos tempos 0, 60, 120 e 180 dias após o início do tratamento, nos grupos controle e suplementados. ....	69
Figura 16. Níveis séricos de IgM (mg/dl) nos tempos 0, 60, 120 e 180 dias após o início do tratamento, nos grupos controle e suplementados. ....	70
Figura 17. Níveis séricos de $\beta$ 2-Microglobulina (ng/dl) nos tempos 0, 60, 120 e 180 dias após o início do tratamento, nos grupos controle e suplementados. ....	71

## Lista de Abreviaturas

AP-1: Proteína ativadora-1 (*Activator Protein-1*)

Apaf-1: Fator indutor da apoptose-1 (*Apoptosis Inducing Factor -1*)

CAT: Catalase

CCR5: Receptor de quimiocinas

CD4: Grupo de diferenciação (*Cluster of differentiation*) de células T restritas à classe II do MHC

CD8: Grupo de diferenciação de células T restritas à classe I do MHC (linfócitos T citotóxicos)

CD27: Grupo de diferenciação de células B de memória

CD27L (CD70): Grupo de diferenciação de linfócitos T e B ativados

CD40: Grupo de diferenciação de linfócitos B, macrófagos, células dendríticas e células endoteliais

CD40L (CD154): Grupo de diferenciação de células T CD4 ativadas

CD95: Antígeno Fas, APO-1

CD95L: Ligante Fas

CDC: *Centers for Disease Control and Prevention*

cdKs: Proteínas quinases dependentes de ciclina (*Cyclin dependent Kinase*)

cFLIP: Proteína inibidora de FLICE (*FLICE-like Inhibitory Protein*)

CTL: Linfócito T citotóxico

CXCR4: Receptor de quimiocinas

CXCR5: Receptor de quimiocinas

DC-SIGN: *Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin*

DD: Domínio de morte (*Death Domain*)

DNA: Ácido desoxirribonucléico

ELISA: Ensaio imunoabsorvente enzima-ligado (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)

EROs: Espécies reativas de oxigênio

FADD: Proteína associada ao domínio de morte ligado ao Fas (*Fas adaptor Death Domain*)

FLICE: Enzima conversora da IL-1 $\beta$  ligada ao FADD (*FADD-like IL-1 $\beta$ -converting enzyme*)

gp41: Glicoproteína 41

gp120: Glicoproteína 120

GSH: Glutathiona reduzida

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana

HIV-1: Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1

HTLV-I: Vírus Linfotrópico Humano tipo 1

HTLV-III: Vírus Linfotrópico Humano tipo 3 (*Human T-Lymphotropic Virus*)

IAP: Proteína inibidora da apoptose (*Inhibitor of Apoptosis Protein*)

IL: Interleucina

IgA: Imunoglobulina A

IgG: Imunoglobulina G

IgM: Imunoglobulina M

I- $\kappa$ B: Proteína inibitória  $\kappa$ -B (*Inhibitor Protein  $\kappa$ -B*)

LAV: Vírus associado a Linfadenopatia (*Lymphadenopathy-associated virus*)

LTR: Repetição terminal longa (*Long Terminal Repeats*)

MHC: Complexo maior de histocompatibilidade (*Major histocompatibility complex*)

mRNA: RNA mensageiro

NAb: anticorpos neutralizantes (*neutralizing antibodies*)

NASBA: Amplificação Seqüencial de Ácidos Nucléicos (*Nucleic Acid Sequence Based Amplification*)

Nef: fator negativo (*Negative Factor*)

NFAT: Fator de Transcrição Nuclear de Células T Ativadas (*Nuclear Transcription Factor of Activated T Cells*)

NF- $\kappa$ B: Fator de Transcrição Nuclear Kappa (*Nuclear Factor Kappa-Binding*)

NK: *Natural Killer*

OX40: Antígeno de células T, membro da família do TNF-R

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase (*Polimerase Chain Reaction*)

PXR: *Pregnane X Receptor*

Rev: Regulador da expressão do gene viral (*Regulator of viral gene expression*)

RNA: Ácido ribonucléico

RXR: *Retinol X Receptor*

SIV: Vírus da Imunodeficiência Símia

smac/DIABLO: Segundo ativador das caspases derivado da mitocôndria (*Second mitochondria-derived activator of caspases/Direct IAP Binding Protein with Low pI*)

SOD: Superóxido dismutase

ssRNA: RNA de fita simples (*single strain RNA*)

TAR: Região de ativação transcricional (*Transcriptional activator region*)

TARV: Terapia antirretroviral

*Tat*: *trans* ativador da transcrição (*trans-activator of transcription*)

TGF- $\beta$ : Fator de Transformação e Crescimento  $\beta$

TNFR-1: Receptor 1 para Fator de Necrose Tumoral (*Tumor Necrosis Factor Receptor-1*)

TNF- $\alpha$ : Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor- $\alpha$* )

TNF- $\beta$ : Fator de Necrose Tumoral  $\beta$  (*Tumor Necrosis Factor- $\beta$* )

USF: *Upstream Stimulatory Factor*

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>2</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>3</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>5</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
1.1 Considerações Gerais .....	15
1.2 Epidemiologia.....	18
1.3 Estrutura do HIV .....	20
1.4 Ciclo de Vida do HIV .....	21
1.5 Evolução da Infecção pelo HIV-1 .....	24
1.6 Terapia Antirretroviral.....	27
1.7 Imunidade Humoral e Citocinas no Paciente HIV Soropositivo .....	29
1.8 Apoptose.....	35
1.8.1. Apoptose no Paciente HIV Soropositivo.....	39
1.9 Estresse Oxidativo, Ascorbato e $\alpha$ -tocoferol .....	42
<b>2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS .....</b>	<b>49</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>51</b>
3.1 Casuística.....	51
3.2 Isolamento das Células Mononucleares .....	53
3.3 Ensaio de Viabilidade Celular .....	54
3.4 Contagem de Linfócitos T CD4 e T CD8.....	57
3.5 Quantificação do RNA do HIV .....	57
3.8 Determinação dos Níveis Séricos das Imunoglobulinas.....	59
3.7 Determinação dos Níveis Séricos de $\beta$ 2-Microglobulina.....	59
<b>4 INFERÊNCIA ESTATÍSTICA.....</b>	<b>60</b>
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>61</b>

5.2 Níveis plasmáticos de RNA do HIV-1 .....	61
5.3 Número de linfócitos CD4.....	62
5.4 Número de linfócitos CD8.....	63
5.5 Relação entre o número de linfócitos CD4 e CD8 .....	64
5.6 Percentual de linfócitos vivos.....	65
5.7 Percentual de linfócitos em apoptose .....	66
5.8 Percentual de linfócitos Inviáveis.....	67
5.9 Níveis séricos de IgA, IgG e IgM.....	68
5.10 Níveis séricos de $\beta$ 2-Microglobulina .....	71
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>72</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>81</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>82</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>99</b>
APÊNDICE 1. Tabelas dos resultados estatísticos dos marcadores avaliados.....	100
APÊNDICE 2. Quadros dos resultados dos marcadores avaliados, por paciente, dos grupos Placebo e Ascorbato .....	106
<b>ANEXOS .....</b>	<b>118</b>
ANEXO 1. Termo de Consentimento .....	119
ANEXO 2. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos.....	121

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Considerações Gerais

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) foi descrita em 1981, nos Estados Unidos, quando foram notificados ao *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) os primeiros casos de pneumonia por *Pneumocystis carinii*, atualmente denominado *Pneumocystis jirovecii*, e de Sarcoma de kaposi em homossexuais masculinos previamente saudáveis, que apresentavam também infecções por outros microrganismos oportunistas, como *Candida albicans* (CDC, 1981; Levy, 1984). Os pacientes apresentavam evidências de disfunção imune, caracterizada por anergia nos testes cutâneos e depleção dos linfócitos T auxiliares (Meyaard, 1993).

Em 1983, o agente etiológico, pertencente à subfamília lentivírus dos retrovírus humanos, foi isolado de maneira independente pelos grupos de Gallo e colaboradores (1983) e Montagnier e colaboradores (Barré-Sinoussi, 1983), a partir de um paciente com AIDS e de um paciente com linfadenopatia persistente. Inicialmente, o vírus recebeu as denominações *Human T-Lymphotropic Virus* (HTLV-III) (Gallo, 1983) e *Lymphadenopathy-associated virus* (LAV) (Barré-Sinoussi, 1983), sendo que em 1986 foi proposta a nomenclatura oficial *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) (Coffin, 1986).

O HIV já foi isolado de praticamente todos os fluídos corporais incluindo sangue, sêmen, secreção vaginal, lágrimas, saliva, urina e leite materno (Barré-Sinoussi, 1983; Gallo, 1984; Levy, 1985) e a transmissão ocorre através de relações sexuais, inoculação de sangue e derivados e da mãe para o conceito (Rachid, 2003).

A transmissão nas relações sexuais é bidirecional, no entanto o risco é maior para as mulheres, sendo aumentado com a prática do intercursos anal e na presença de úlceras genitais. O uso de drogas injetáveis e o contato sexual onde há o contato com sangue e

esperma contaminados são as principais vias de transmissão (Friedland, 1987). Co-infecções que comprometem a integridade da mucosa urogenital facilitam a infecção pelo HIV através do contato sexual. A inflamação local decorrente dessas infecções resulta na ativação das células T e, conseqüentemente, aumenta a replicação viral (Sleasman, 2003). A transmissão da mãe para o filho pode ocorrer durante a gestação, no momento do parto ou durante a amamentação, sendo que o risco de transmissão aumenta à medida que progride a imunodeficiência da mãe (Rachid, 2003). Na ausência de terapia antirretroviral, aproximadamente 20% a 30% das crianças nascidas de mães infectadas tornam-se HIV soropositivas (Mofenson, 1997).

O diagnóstico da infecção pelo HIV precisa obedecer aos seguintes critérios, estabelecidos pelo Ministério da Saúde:

i) Resultados positivos em dois testes sorológicos de triagem para detecção de anticorpos anti-HIV (anti-HIV-1 e anti-HIV-2) do tipo ELISA, com princípios metodológicos distintos, seguidos de resultado positivo em teste sorológico de caráter confirmatório, tipo imunofluorescência indireta, Western Blot ou testes de amplificação de ácidos nucléicos como, por exemplo, a reação em cadeia da polimerase (PCR) e a amplificação seqüencial de ácidos nucléicos (NASBA) (Ministério da Saúde, 2004).

ii) Resultado positivo em um dos seguintes testes virológicos:

- Detecção do ácido nucléico do HIV por PCR ou NASBA (*Nucleic Acid Sequence Based Amplification*);
- Teste para antígeno p24;
- Isolamento do HIV por cultura viral (CDC, 1999).

Após diagnóstico confirmatório de infecção pelo HIV, segue-se o estadiamento e a definição dos casos de AIDS, baseando-se em critérios clínicos e laboratoriais. A

classificação da infecção pelo HIV segue estadiamento proposto pelo CDC de Atlanta (EUA) que classifica a doença em três categorias:

**Categoria A:** pacientes soropositivos para o HIV e que atendam a uma ou mais das seguintes condições:

- Infecções assintomáticas;
- Linfadenopatia;
- Infecção sintomática aguda (síndrome retroviral)

**Categoria B:** nesta categoria, enquadram-se pacientes sintomáticos que apresentam uma ou mais das seguintes condições:

- Candidíase orofaríngea persistente;
- Sintomas constitucionais como febre ( $>38^{\circ}\text{C}$ ) ou diarreia persistente por mais de 1 mês;
- Púrpura trombocitopênica idiopática;
- Listeriose;
- Neuropatia periférica.

**Categoria C:** os pacientes uma vez classificados nesta categoria, aí se mantêm. As principais condições clínicas são:

- Candidíase traqueal, bronquial ou pulmonar;
- Câncer cervical invasivo;
- Coccidioomicose, disseminada ou extrapulmonar;
- Criptococose extrapulmonar;
- Criptosporidiose e/ou isosporidiose intestinal crônica (superior a 1 mês);
- Encefalopatia relacionada ao HIV;
- Sarcoma de Kaposi;

- Complexo *Mycobacterium avium*, disseminado ou extrapulmonar;
- Tuberculose, pulmonar ou extrapulmonar;
- Septicemia recorrente por *Salmonella*;
- Perda involuntária de peso, superior a 10% do peso corporal.

A subdivisão dessas categorias é feita de acordo com a contagem de linfócitos CD4+ no sangue periférico:

Categorias A1, B1, <i>C1</i>	CD4+ > 500/ $\mu$ l
Categorias A2, B2, <i>C2</i>	CD4+ de 200 a 499/ $\mu$ l
Categorias <i>A3, B3, C3</i>	CD4+ < 200/ $\mu$ l

O diagnóstico de AIDS é definido a todos os pacientes da categoria C, bem como todos os que se enquadram na subcategoria 3 (CDC, 1992).

Segundo os critérios atuais de definição de casos de AIDS do Ministério da Saúde, para fins de vigilância epidemiológica, será considerado caso de AIDS, todo indivíduo com 13 anos ou mais que apresentar resultado positivo em dois testes de triagem para detecção de anticorpos anti-HIV ou um teste confirmatório reagente, no qual seja diagnosticada imunodeficiência; pelo menos uma doença indicativa de AIDS e/ou contagem de linfócitos T CD4 inferior a 350 células/mm<sup>3</sup>. Contudo, a TARV (terapia antirretroviral) só é instituída quando a contagem de linfócitos T CD4 for inferior a 200 células/mm<sup>3</sup> (Ministério da Saúde, 2004).

## 1.2 Epidemiologia

No final de 2004, a Organização Mundial da Saúde (OMS) e o Programa Conjunto das Nações Unidas para HIV/AIDS (UNAIDS) estimavam haver 39,4 milhões de pessoas infectadas com o vírus da AIDS em todo o mundo. Destes, 37,2 são adultos, 17,6 são mulheres e 2,2 milhões são crianças com menos de 15 anos de idade, e estimava-se que

mais de 20 milhões já haviam morrido. Foram registrados 4,9 milhões de novos casos, 4,3 milhões em adultos e 640.000 em crianças (UNAIDS/WHO, 2004).

Informações obtidas nos boletins de notificação indicam que a grande maioria das infecções pelo HIV afetava o grupo de homossexuais masculinos, no início da epidemia. Atualmente, as relações sexuais desprotegidas entre homens e mulheres e o uso de drogas injetáveis lideram as vias de transmissão (UNAIDS/WHO, 2004; Boletim Epidemiológico, 2004).

Dados obtidos até junho de 2004 indicam 362.364 casos acumulados de AIDS registrados no Brasil, sendo que as regiões Sudeste e Sul lideram, com 235.419 e 63.515 casos acumulados de AIDS, respectivamente. Na região Sudeste registrou-se 7.743 novos casos até junho de 2004, enquanto na região Sul notificou-se 2.843 novos casos de AIDS neste mesmo período (Boletim Epidemiológico, 2004).

Em Santa Catarina foram registrados 15.637 casos acumulados de AIDS até junho de 2004 (Boletim Epidemiológico, 2004). Dentre os 100 municípios com maior número de casos notificados no Brasil, Florianópolis está na décima oitava posição, de acordo com dados obtidos até dezembro de 2003, com 2.486 casos registrados e Itajaí com 1.591 casos, ocupa a vigésima oitava posição. No que se refere à incidência de AIDS por 100.000 habitantes em todo o país, a cidade de Itajaí (SC) está em primeiro lugar com 97,1/100.000 habitantes e Florianópolis (SC) 7º lugar com 65,6/100.000 habitantes (Boletim Epidemiológico, 2003).

A epidemia de AIDS vem tendo impacto negativo sobre a expectativa de vida nas últimas 3 décadas, principalmente na África Sub Sahara, onde os recursos para tratamento da infecção pelo HIV são escassos, e a demanda por cuidados médicos relacionados à infecção sobrecarrega os sistemas de saúde, que já se encontram fragilizados nestas regiões (UNAIDS/WHO, 2004).

A AIDS exacerba a pobreza nos países mais pobres, pois atinge pessoas na fase mais produtiva de suas vidas, tolhe vidas deixando órfãos aos cuidados do Estado ou de parentes.

Nos últimos anos o Brasil ampliou fortemente a distribuição dos medicamentos antirretrovirais, melhorando a expectativa e a qualidade de vida dos pacientes com AIDS.

### **1.3 Estrutura do HIV**

O HIV pertence a um grupo de retrovírus denominados lentivírus, do latim - *lentus*, devido ao curso gradual da doença que eles causam (Korber, 1998). Esses vírus persistem e continuam a se replicar por muitos anos antes de causar sinais evidentes de doença (Turner, 1999).

Trata-se de um vírus envelopado, a partícula viral completa possui aproximadamente 100 nm de diâmetro e apresenta uma bicamada lipídica, derivada da membrana celular do hospedeiro, onde estão localizadas as glicoproteínas gp120 e gp41; a gp 120 tem localização externa enquanto a gp41 é de localização transmembrana (Arthur, 1992).

O capsídeo viral é composto pela p24 que engloba o genoma de duas fitas de RNA e as enzimas integrase, protease e transcriptase reversa (Sleasman, 2003).

Como todos os retrovírus, o HIV possui um genoma de RNA flanqueado por longas repetições terminais (LTR), envolvidas na integração e na regulação do genoma viral (Turner, 1999). Da mesma forma que outros retrovírus, o HIV possui três genes principais – *gag*, *pol* e *env*. O gene *gag* codifica as proteínas estruturais do cerne viral, o gene *pol* codifica as enzimas envolvidas na integração e replicação do vírus, enquanto o gene *env* codifica as proteínas do envelope viral (Trono, 1995).

O HIV possui outros seis pequenos genes que codificam proteínas que afetam a replicação viral e a infectividade: *Tat*, *Rev*, *Nef*, *Vif*, *Vpu* e *Vpr* (Trono, 1995; Sleasman, 2003).

#### 1.4 Ciclo de Vida do HIV

As células que expressam a molécula CD4 em sua superfície são os principais alvos da infecção pelo HIV. O vírus infecta linfócitos T CD4, células dendríticas e células da linhagem dos monócitos como macrófagos, células da microglia e fibroblastos (Fauci, 1988; Cohen, 1999; Marcello, 2004). Com base em estudos *in vitro*, duas vias pelas quais a infecção primária ocorre são aceitas: i) O HIV pode se ligar aos receptores DC-SIGN<sup>1</sup> (*Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin*), específicos das células dendríticas (Baribaud, 2001). Embora as células dendríticas não sejam infectadas e a replicação do vírus nessas células não seja eficiente (Alfano, 2005), migram para os linfonodos, onde a infectam as células T CD4 e macrófagos, através do contato célula-célula; ii) alternativamente, os macrófagos e as células T CD4 presentes na submucosa podem ser infectados diretamente, através do contato com células infectadas presentes nas secreções do parceiro infectado (Zhang, 1999).

A infecção ocorre através da interação entre as proteínas gp120 e gp41 do envelope viral e o receptor CD4 da superfície das células hospedeiras (Poli, 1993). Os receptores de quimiocinas CXCR4 presentes em linfócitos e CCR5 em monócitos/macrófagos também são necessários para que ocorra a infecção (Chapham, 1997; Castedo, 2001).

Após a fusão com a célula alvo, o HIV libera o seu RNA no citoplasma onde por ação da enzima viral transcriptase reversa é transcrito para DNA e posteriormente

integrado ao genoma da célula hospedeira por ação da enzima integrase. O DNA do HIV integrado é então denominado provírus (Weiss, 2001).

A transcrição dos genes a partir do DNA do provírus integrado é regulada pelas LTRs dos genes estruturais virais, sendo que estas possuem seqüências específicas que constituem sítios de ligação para fatores de transcrição de células do hospedeiro. Atualmente são conhecidos quatro diferentes fatores de transcrição capazes de se ligar às LTRs do HIV: AP-1, NFAT, Sp-1 e NF- $\kappa$ B (Lusic, 2003; Wu, 2003; Marcello, 2004). No entanto, o complexo NF- $\kappa$ B (p50/p65) liga-se predominantemente a essas regiões (Henkel, 1993; Bossis, 2000).

Certos estímulos à célula alvo são necessários para que o ciclo de replicação viral inicie. Estes podem ser decorrentes da ação de citocinas como TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IL-1, IL-2, IL-6 e espécies reativas de oxigênio (EROs) que ativam o fator de transcrição nuclear NF- $\kappa$ B. O NF- $\kappa$ B encontra-se no citoplasma e sua ativação ocorre através da fosforilação e proteólise do I- $\kappa$ B, sua porção inibitória, e subsequente translocação para o núcleo, onde se liga às LTRs do HIV (Henkel, 1993; Jeeninga, 2000; Bossis, 2000).

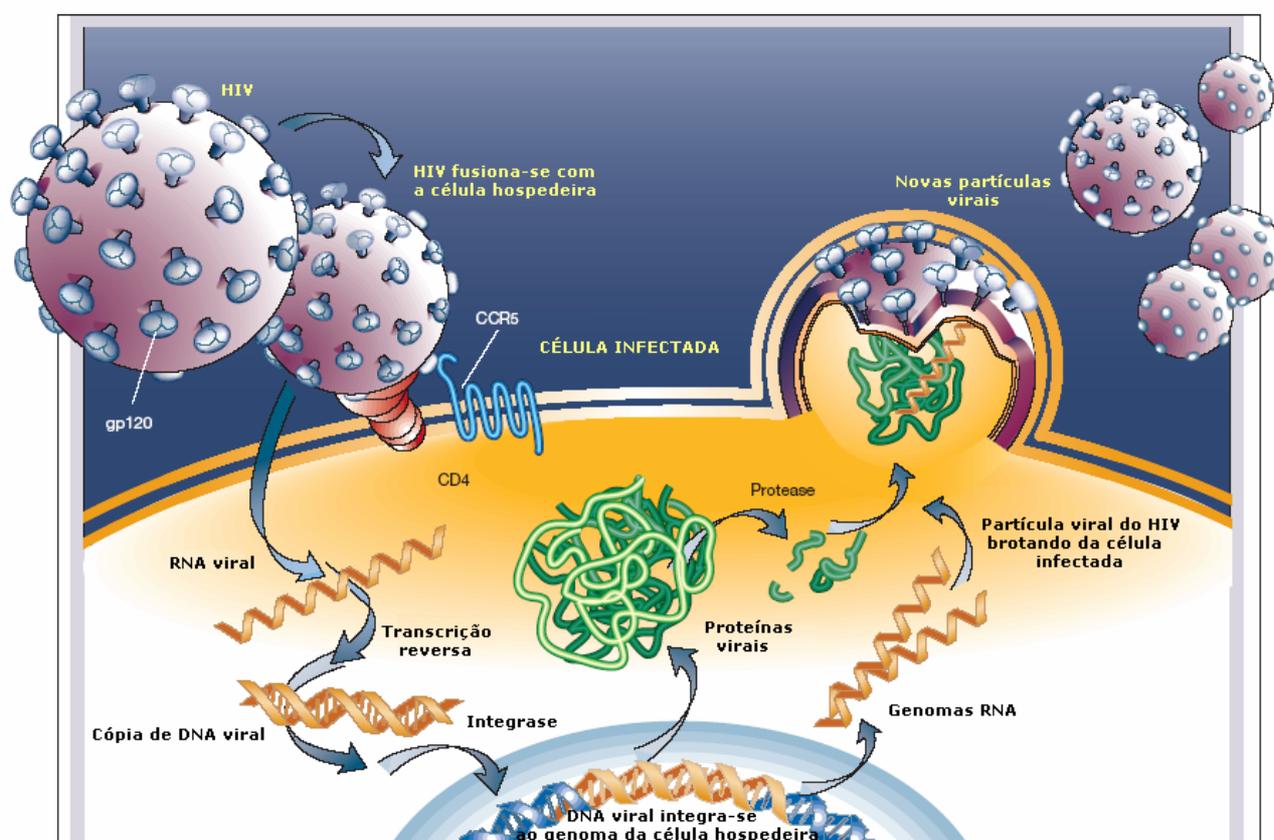
Inicialmente, pequenos transcritos de RNA viral que codificam as proteínas regulatórias *Tat*, *Rev* e *Nef* são sintetizados (Turner, 1999). A proteína viral *Tat* é um potente regulador de transcrição, funciona como um fator de alongação que permite a transcrição do RNA viral pelo complexo RNA Polimerase II (Marcello, 2001).

A *Tat* possui dois sítios de ligação presentes em um único domínio, conhecido como domínio de transativação; o primeiro sítio permite que a *Tat* se ligue a uma proteína

---

<sup>1</sup> A molécula DC-SIGN, expressa na superfície das células dendríticas (CD), é uma lectina tipo-C específica, mediadora da adesão da CD à célula T CD4, através da ligação com a ICAM-3, molécula intercelular de adesão, que se expressa na célula T CD4 (Geijtenbeek, 2000).

celular do hospedeiro, a ciclina T1<sup>2</sup>. Essa reação de ligação promove a ligação da *Tat* através do segundo sítio de ligação, no seu domínio de transativação, a uma seqüência específica de RNA na LTR conhecida como região de ativação transcricional (TAR), aumentando a taxa de transcrição viral por meio da retirada dos fatores de alongação negativa que bloqueiam a atividade da RNA Polimerase II (Kobor, 2002; Brigati, 2003).



Adaptado de Weiss, 2001.

### Figura 1: Ciclo de vida do vírus HIV-1.

O HIV se liga às células que expressam o receptor CD4 por meio de um complexo de duas glicoproteínas, gp120 e gp41, expresso como uma estrutura trimérica na membrana do vírus. A porção gp120 desse complexo se liga à molécula CD4, induzindo alteração da conformação permitindo uma ligação secundária ao co-receptor, CXCR4 e CCR5, que são receptores de quimiocinas. Esta ligação ao co-receptor induz alteração conformacional na gp41 que expõe uma região hidrofóbica que se insere na membrana celular e promove fusão da membrana viral. Após a fusão, o vírus libera seu conteúdo no citoplasma da célula hospedeira e dá início às etapas de transcrição, onde as fitas de RNA são transcritas para DNA por ação da enzima viral transcriptase reversa. O DNA complementar é então transportado para dentro do núcleo e integrado ao genoma da célula hospedeira, por ação da enzima integrase, sendo denominado pró-vírus. A primeira etapa do ciclo de replicação inicia após a célula hospedeira ter sido estimulada pela ação de citocinas e EROs, que ativam os fatores de transcrição celular. A síntese das proteínas que irão compor as estruturas do HIV se dá no citoplasma, pela tradução dos fragmentos de RNAm produzidos a partir do DNA viral interado. A enzima protease cliva as proteínas imaturas do HIV em proteínas virais funcionais e novos vírus brotam da célula hospedeira.

<sup>2</sup> Família de proteínas que regula a atividade das CdKs (proteínas quinases dependentes de ciclina) e controla a progressão através do ciclo celular (Cooper, 2001).

A proteína viral *Nef* está envolvida na regulação de fatores de transcrição celulares, dentre eles o NFAT (Fator de Transcrição Nuclear de Células T Ativadas) promovendo a replicação do HIV de maneira indireta, considerando-se que a ativação dessas células é necessária para que ocorra a replicação viral (Lahti, 2003).

No núcleo da célula hospedeira, a proteína acessória *Rev* se liga a uma seqüência específica do RNA, chamada elemento de resposta ao *Rev* (RRE) e também a uma proteína de transporte núcleo-citoplasma do hospedeiro, *Crm1*, ativando a via de transporte das seqüências de mRNA do núcleo para o citoplasma, onde ocorre a síntese das proteínas do HIV (Turner, 1999).

Nesta etapa, a enzima protease cliva as proteínas imaturas do HIV-1 em proteínas virais funcionais e novos vírus brotam da célula infectada (Figura 1); a rapidez de produção do vírus poderá alcançar níveis suficientemente elevados para causar a morte celular (McCune, 2001).

### **1.5 Evolução da Infecção pelo HIV-1**

O curso típico da infecção pelo HIV *in vivo* (Figura 2) é caracterizado por três fases: infecção aguda ou primária, fase assintomática ou latência clínica e fase sintomática (Pantaleo, 1993; Touloumi, 2000).

Quando os vírions do HIV-1, presentes no sangue, sêmen ou em outros fluidos corporais de um indivíduo infectado penetram nas células de um outro indivíduo pelos eventos de fusão mediados pelos receptores, anteriormente citados, ocorre a infecção primária (Chapham, 1997).

Dentro de dias após a infecção pelo HIV-1 pode ser detectada abundante replicação nos linfonodos, a qual induz viremia, com um número elevado de partículas virais no sangue periférico. A infecção primária pelo HIV é geralmente assintomática, no entanto,

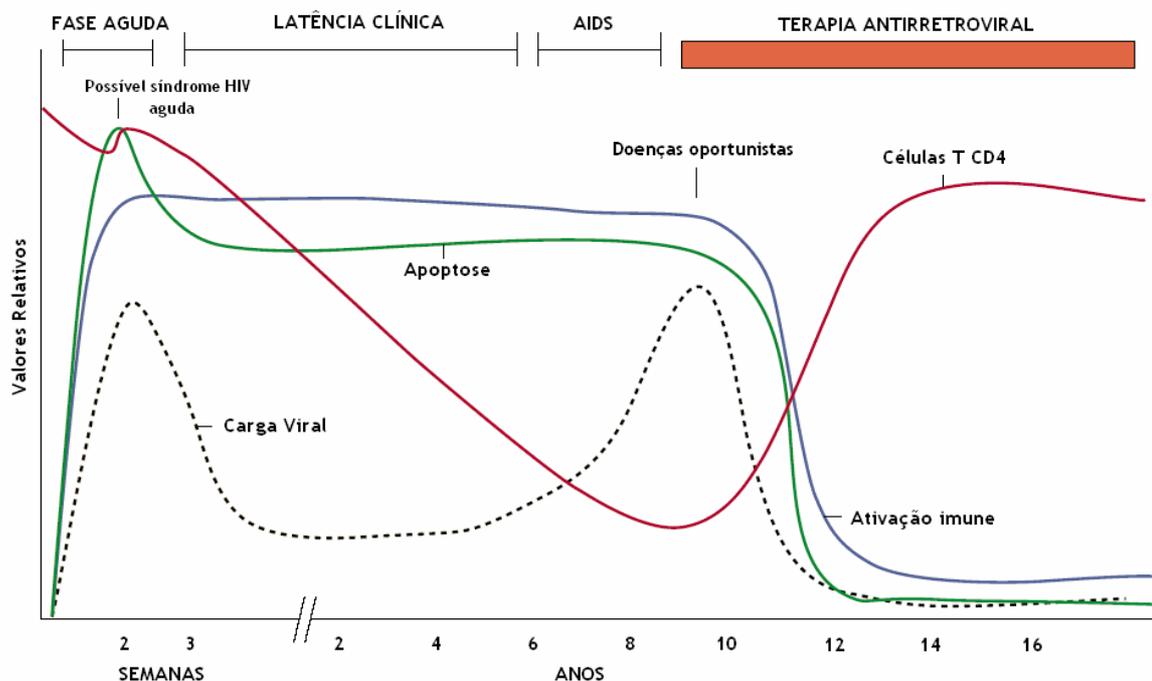
cerca de 50% dos pacientes experimentam uma síndrome viral aguda que consiste em uma variedade de sinais e sintomas semelhantes à influenza, com febre, cefaléia, faringite, linfadenopatia generalizada e erupções cutâneas (Pantaleo, 1993; Graziosi, 1993; Sleasman, 2003).

Durante esta fase aguda, a viremia permite ao vírus disseminar-se por todo corpo e infectar as células T auxiliares, monócitos e macrófagos nos tecidos linfóides periféricos. Esta viremia aguda está associada com a ativação das células T CD8 específicas, que controlam temporariamente a replicação, porém não são capazes de eliminar a infecção (Papagno, 2004).

A resposta dos linfócitos T citotóxicos (CTL) atinge o pico em 9 a 12 semanas, com acentuada expansão de clones de células T CD8 específicas para o HIV-1, sendo que até 10% dos CTL podem ser específicos contra o vírus. Neste período observa-se também o desenvolvimento da resposta imune humoral contra o HIV-1, com a produção de anticorpos específicos ou soroconversão (Touloumi, 2000), com predominância de anticorpos contra as proteínas do envelope, gp120 e gp41, e proteínas do cerne viral, p24 e p17 (De Milito, 2004a). Inicialmente desenvolve-se uma resposta imune humoral vigorosa, com anticorpos neutralizantes (NAb) contra a gp 120 do envelope viral, que retarda e controla a progressão da doença. No entanto, devido à variabilidade genética nas proteínas do envelope, a resposta dos NAb falha e o vírus escapa à resposta imune humoral (Richman, 2003).

Apesar da resposta imune humoral controlar temporariamente a progressão da infecção, quando uma partícula viral é recoberta com anticorpos a fagocitose pelos macrófagos é facilitada; sendo os macrófagos células resistentes à atividade citolítica do HIV, tornam-se então reservatórios e meio de transporte para o vírus (Touloumi, 2000).

A maioria dos pacientes infectados pelo HIV-1 desenvolverá a doença após um período de latência clínica ou período assintomático. Durante esse período ocorre replicação persistente do vírus e declínio gradual da função e do número das células T CD4 (McCune, 2001).



Adaptado de Gougeon, 2003.

**Figura 2. Curso típico da doença pelo HIV-1, antes e depois da terapia antirretroviral.**

A doença pelo HIV começa por infecção aguda, parcialmente controlada pela resposta imune adquirida. Dentro de dias após a infecção primária podem ser detectados altos níveis de partículas do HIV no plasma, o que pode ser acompanhado pela doença HIV aguda. Neste período ocorre abundante replicação viral nos linfonodos e o vírus dissemina-se por todo organismo. À medida que a infecção se dissemina, o sistema imune específico produz respostas humorais e celulares dirigidas aos antígenos do HIV e em aproximadamente 12 semanas após a infecção a viremia plasmática cai para níveis mais baixos. Em uma segunda fase da infecção, denominada latência clínica, são produzidos baixos níveis de partículas virais, porém a destruição das células T CD4 dentro dos órgãos linfóides progride constantemente e o número de células T CD4 no sangue periférico declina gradualmente. Quando o número de células CD4 cai para níveis críticos, abaixo de 200 células /mm<sup>3</sup>, aparecem as infecções oportunistas características da AIDS e progressão, quase que invariavelmente para a morte. Com a instituição da terapia antirretroviral, a replicação viral é suprimida, o que está associado à diminuição da ativação imune, diminuição dos níveis de apoptose e aumento da contagem de células CD4.

Ocorrem ciclos contínuos de infecção e destruição dessas células quando os pacientes são assintomáticos e calcula-se que o HIV destrói até  $1 \times 10^9$  células T CD4 por dia (HO, 1995). Inicialmente o organismo continua a produzir novas células T CD4 e essas células podem ser rapidamente substituídas; no entanto, a destruição celular contínua e a

conseqüente desorganização dos tecidos linfóides com comprometimento na produção, levam a um declínio do número de células T CD4 no sangue periférico (Sleasman, 2003). Quando a contagem das células T CD4 declina abaixo de um nível crítico ( $< 200/ \text{mm}^3$ ) o paciente torna-se susceptível às infecções oportunistas características da AIDS (Vergis, 2000).

A administração da terapia antirretroviral (TARV) promove queda da viremia, com diminuição da expressão dos marcadores de ativação, diminuindo os níveis de apoptose e contribuindo para o aumento concomitante na contagem de células T CD4 (Gougeon, 2003).

## **1.6 Terapia Antirretroviral**

Embora nenhuma terapêutica seja curativa, a introdução da terapia antirretroviral e o emprego rotineiro de profilaxia para infecções oportunistas aumentaram significativamente o tempo e a qualidade de vida dos pacientes infectados pelo HIV (Autran, 1999; Rachid, 2003; Gougeon, 2003).

No período de 1987 a 1994, somente análogos de nucleosídeos, inibidores da transcriptase reversa, encontravam-se disponíveis para uso clínico. Durante 1995 e 1996, grandes mudanças ocorreram, principalmente em decorrência de novos conhecimentos sobre a patologia da infecção pelo HIV e a possibilidade de quantificar a carga viral. O advento de novos agentes antirretrovirais, principalmente inibidores da enzima protease, trouxe novas perspectivas para o tratamento da infecção pelo HIV-1 (Cameron, 1998; Staszewski, 1999; Rachid, 2002).

Os antirretrovirais têm por objetivo bloquear a transcrição do RNA viral (ITRN e ITRNN), a clivagem das proteínas do HIV que garantem sua infectividade (IP) e a inibição da fusão do vírus às células alvo (Inibidores de fusão) (Chaix, 2000). Quatro classes de

antirretrovirais estão disponíveis para uso na clínica, inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (ITRN), inibidores da transcriptase reversa não nucleosídeos (ITRNN) e os inibidores de protease (IP). Recentemente, medicamentos antirretrovirais que se ligam à proteínas do envelope do HIV envolvidas na fusão do vírus às suas células alvo, também estão sendo utilizados como coadjuvantes na terapia antirretroviral (Lalezari, 2003).

De acordo com o Ministério da Saúde (2004), o tratamento antirretroviral é indicado para todos os pacientes infectados pelo HIV, sintomáticos ou assintomáticos, que apresentam contagem de linfócitos T CD4 abaixo de  $200/\text{mm}^3$ , sendo que quando o paciente assintomático apresenta contagem de linfócitos T CD4 entre 200 e  $350/\text{mm}^3$ , o início da terapia antirretroviral deve ser considerado conforme a evolução dos parâmetros imunológicos e virológicos, bem como outras características do paciente como motivação, capacidade de adesão e co-morbidades (Ministério da Saúde, 2004). Dentro dessa faixa, a monitoração clínico-laboratorial e a reavaliação da necessidade do início da terapia antirretroviral devem ser mais freqüentes (Ministério da Saúde, 2004), já que a queda dos linfócitos T CD4 para menos de  $200/\text{mm}^3$  é indesejável, por estar associada ao aumento na incidência de infecções oportunistas e resposta terapêutica menos duradoura (Gallant, 2002).

A terapia precoce deve ser evitada, pois pode ser responsável pela limitação de opções para alteração de tratamento em caso de intolerância à medicação, desenvolvimento de resistência e falha terapêutica (Ministério da Saúde, 2004). Ademais, efeitos colaterais potencialmente graves associados ao uso prolongado de antirretrovirais como dislipidemia e acidose láctica são descritos com freqüência (Liszewicz, 2002; Hui, 2003; Ammaranond, 2003).

Nos últimos anos demonstrou-se que há recuperação imune celular, ao menos parcial, nos pacientes com AIDS após a introdução da terapia antirretroviral, sendo que as infecções oportunistas nesses pacientes ocorrem nos mesmos níveis de CD4 que em pacientes sem tratamento (Gallant, 2002).

### **1.7 Imunidade Humoral e Citocinas no Paciente HIV Soropositivo**

Em pacientes soropositivos para o HIV ocorre desequilíbrio nas funções do sistema imune, que pode ser demonstrado pela diminuição progressiva da contagem de células T CD4 e pela hiperatividade das células B, resultando em um estado de grave imunodeficiência e susceptibilidade às infecções oportunistas que caracterizam a AIDS (Nagase, 2001; Malaspina, 2003).

O HIV persiste no hospedeiro, apesar do desenvolvimento da resposta imune e da administração da TARV, sendo a constante exposição do sistema imune aos antígenos virais, responsável pela ativação imune crônica verificada no paciente HIV soropositivo. A ativação imune crônica persiste durante todo processo infeccioso e manifesta-se *in vivo* pela hiperplasia folicular dos tecidos linfóides (linfadenopatia), aumento da expressão dos marcadores de ativação nas células T, ativação policlonal das células B com aumento dos níveis séricos das Imunoglobulinas, IgA, IgG e IgM, e aumento dos níveis plasmáticos de marcadores de ativação como neopterina e  $\beta_2$ -microglobulina<sup>3</sup> (De Milito, 2004a).

Os níveis séricos de IgA, tem importante valor preditivo de posterior diminuição da contagem de linfócitos T CD4, em estágios iniciais da infecção (Philips, 1993), sendo que a elevada secreção de IgG e IgM, reflete a ativação policlonal dos linfócitos B nesses pacientes (Müller, 1998).

---

<sup>3</sup> A  $\beta_2$ -microglobulina é uma proteína de baixo peso molecular que forma os antígenos de cadeia leve constante do MHC de classe I, presente na maioria das células somáticas (Shi, 1997).

A  $\beta_2$ -microglobulina tem seus níveis séricos aumentados em consequência da ativação imunológica e destruição das células linfóides e é utilizada como fator prognóstico da evolução da infecção pelo HIV. Níveis séricos elevados de  $\beta_2$ -microglobulina são preditivos para a diminuição da contagem de células T CD4 (Ashton, 1998).

A hipergamaglobulinemia e a secreção aumentada de anticorpos pelas células B são características precoces da infecção pelo HIV, demonstrando o estado hiperativo dessas células desde os estágios iniciais da infecção (De Milito, 2001). Apesar desse estado hiperativo, a produção de imunoglobulinas induzida por mitógenos *in vitro* e a produção de anticorpos antígeno-específicos após a imunização, estão gravemente comprometidas (Moir, 2001; Nagase, 2001).

Nos pacientes soropositivos para o HIV a hipergamaglobulinemia está associada ao surgimento de anticorpos contra antígenos próprios, como por exemplo, auto-anticorpos contra fosfolípidios, neutrófilos, moléculas HLA (antígeno leucocitário humano), antígenos nucleares e DNA, actina e miosina, levando ao desenvolvimento de doenças autoimunes (Quan, 2001).

Observam-se também outros sinais de hiperatividade das células B, como aumento do risco de transformação neoplásica (Gaidano, 2000) e aumento da expressão de marcadores de ativação, como Fas, CD5, CD21 (Moir, 2001) e CD38 (Fournier, 2002).

A disfunção das células B pode ser decorrente de um conjunto de fatores: i) o perfil de citocinas característico da infecção pelo HIV, como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 e IL-15 (Müller, 1998; Fournier, 2002; De Milito, 2004b); ii) diminuição da população de células T CD4 e conseqüente comprometimento da cooperação entre as células T e as células B, visto que a resposta humoral efetiva é dependente de interações celulares bidirecionais entre as T e B (CD40-CD154, CD27-CD70, CD80/CD86-CD28, OX40-OX40L) (Walker,

2000; Malaspina, 2003); iii) efeito direto do HIV e suas proteínas (*Tat*, *Nef*, *gp120*) sobre as células B (Lefevre, 1999; Nagase, 2001).

Estudos recentes demonstraram que a viremia induz ao aparecimento de uma subpopulação de células B CD21<sup>-</sup>, que apresentam características de plasmócitos, com secreção elevada de imunoglobulinas; esta população celular pode contribuir para a hipergamaglobulinemia observada nos pacientes HIV soropositivos (Moir, 2001; Malaspina, 2003; De Milito, 2004b).

A diminuição das células T CD4, característica marcante da infecção pelo HIV, também acarreta a diminuição do CD154. O CD154 (CD40L) é uma molécula co-estimuladora presente nas células T CD4, que se liga ao CD40 nas células B, provocando assim sua ativação (Klaus, 2001). A interação entre o CD40 nos linfócitos B e o CD40L nas células T é necessária para que ocorra inversão de classes das imunoglobulinas e formação dos linfócitos B de memória, necessários para que ocorra a resposta antígeno específica (Arpin, 1995; Klaus, 2001).

No paciente HIV soropositivo observa-se a diminuição da população de linfócitos B expressando CD27, característica dos linfócitos B de memória (Agematsu, 2000). O CD27 é uma glicoproteína transmembrana tipo I da família dos receptores do Fator de Necrose Tumoral (TNF-R) (Camerini, 1991); quando interage com seu ligante CD70 (CD27L), expresso nos linfócitos T ativados, promove a diferenciação dos linfócitos B de memória em plasmócitos (Nagase, 2001).

Nagase e colaboradores (2001), observaram o aumento da expressão do CD70 pelos linfócitos T ativados isolados de pacientes HIV soropositivos e sugerem que a interação CD27/CD70 está implicada na plasmocitose, na hipergamaglobulinemia e na diminuição das células de memória nesses pacientes. De acordo com De Milito e colaboradores (2004b), os altos níveis de expressão do CD70 nas células T contribuem para a diminuição

das células B CD27, induzindo a diferenciação das células B em plasmócitos e privando essas células de fatores de crescimento, desencadeando a apoptose.

De Milito e colaboradores (2001) verificaram que o número de células B CD27 não está correlacionado com a contagem de células CD4, pois os mesmos números de células B de memória foram encontrados em pacientes HIV soropositivos com contagens de CD4 acima ou abaixo de  $390/\text{mm}^3$ . Igualmente, pacientes submetidos à terapia antirretroviral e pacientes virgens de tratamento, apresentaram os mesmos valores de CD27. Estes achados sugerem que a perda das células B de memória ocorre no início da infecção e não é corrigida após a terapia antirretroviral (De Milito, 2001). Associado à diminuição do número de células B CD27, a maior parte das células B de pacientes HIV soropositivos é composta por células B *naïve* (Nagase, 2001), que respondem de maneira ineficiente aos antígenos e contribuem, em grande parte, para a hipergamaglobulinemia observada na infecção pelo HIV (Hunziker, 2003; De Milito, 2004b).

A ativação imunológica que ocorre no início da infecção pelo HIV, persiste durante o processo infeccioso e envolve a produção aumentada de citocinas<sup>4</sup> como IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  que estimulam a replicação viral, contribuindo diretamente para a patogênese do HIV e progressão para AIDS. Este estado crônico de ativação imunológica é importante porque as células linfóides devem estar ativadas para tornarem-se infectadas pelo HIV (Breen, 2002).

O maior estímulo para produção de IL-6 é a secreção de IL-1 e TNF- $\alpha$ . Esta citocina é importante no processo inflamatório, pois induz o fígado a secretar as chamadas proteínas de fase aguda, como os fatores do complemento e a proteína C reativa, que atuam

---

<sup>4</sup> Citocinas são glicoproteínas de baixo peso molecular secretadas por leucócitos e outros tipos celulares (Breen, 2002). As citocinas podem ser classificadas de acordo com sua função, em pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$ ) e anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- $\beta$ ), ou de acordo com o tipo de linfócito T auxiliar que

como opsoninas. Agindo sobre as células B, a IL-6 promove o crescimento e diferenciação dessas células, possuindo um efeito importante sobre a mudança de classes dos anticorpos tipo IgG (van der Meijdem, 1998).

As mudanças nos níveis de citocinas nos pacientes infectados pelo HIV podem afetar o funcionamento do sistema imune causando impacto direto no curso da infecção, aumentando a replicação viral. Particularmente o balanço entre as citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$  que agem em conjunto aumentando a replicação do HIV e IL-10, que age estimulando as células B, podem ter um papel importante na progressão para AIDS (Breen, 2002).

Os pacientes HIV soropositivos apresentam elevados níveis de TNF- $\alpha$ , sendo que esta citocina tem a capacidade de ativar o NF- $\kappa$ B, aumentando os níveis de replicação viral (Badley, 2000). Juntamente com a IL-1, o TNF- $\alpha$  é responsável pelos sintomas constitucionais como febre e anorexia, comuns nesses pacientes (Fauci, 1996; Mahlknecht, 2000).

A primeira ligação entre as citocinas pró-inflamatórias e a doença pelo HIV foi demonstrada pela capacidade do HIV estimular a secreção de IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  *in vitro*, em culturas de monócitos, isolados a partir do sangue periférico de pacientes soronegativos (Nakajima, 1989; Merrill, 1989). Outros trabalhos demonstraram a presença dessas citocinas no soro e no sobrenadante de culturas celulares de pacientes HIV soropositivos (Weiss, 1989; Breen, 1990; Fauci, 1996; Elbim, 2001; Alfano, 2005).

A resposta imune celular que ocorre no início da infecção pelo HIV, facilitada pelo fenótipo Th1, controla os níveis de replicação viral; no entanto, com o decorrer do tempo, o fenótipo Th2 torna-se predominante ocasionando perda da imunidade mediada por

---

a produz: citocinas sintetizadas pelas células Th1: IL-1, IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e pelas células Th2: IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 (Breen, 2002).

células. Em consequência ocorre o aumento dos níveis de RNA viral bem como dano ao sistema imune e progressão para AIDS (Cleirici, 1994; Sarih, 1996).

Citocinas antiinflamatórias como IL-4, IL-10, IL-13 e TGF- $\beta$  inibem tanto as respostas da imunidade inata quanto da imunidade adaptativa (Alfano, 2005). A IL-4 desempenha um papel importante no contexto da infecção pelo HIV, incluindo a indução da expressão do receptor DC-SIGN nas células dendríticas (Relloso, 2002). Após estimulação, essas células secretam IL-4, um fator de crescimento autócrino, ativador da resposta Th2 e inibidor da população Th1 (Alfano, 2005).

Desde sua descrição, há cerca de dez anos, a IL-10 tem sido objeto de muitos estudos no contexto da infecção pelo HIV (Breen, 2002). A IL-10 é secretada por monócitos/macrófagos, células B, células T e células dendríticas (Moore, 2001). É um forte promotor da resposta Th2 (Banchereau, 2003), primeiramente conhecida como “Fator Inibitório da Síntese de Citocinas” por sua habilidade em inibir a síntese de citocinas e quimiocinas nos linfócitos T, células NK e macrófagos (Fiorentino, 1989).

Uma vez purificada, verificou-se que a IL-10 possui outras atividades que incluem a inibição direta dos macrófagos como células apresentadoras de antígeno, através da redução da expressão das moléculas MHC (complexo de histocompatibilidade principal) de classe II (Fiorentino, 1991; Moore, 2001), inibição da liberação de IL-1 e TNF- $\alpha$  (Breen, 2002), diminuição da expressão de moléculas co-estimulatórias nas células dendríticas (Moore, 2001) e monócitos/macrófagos (Contreras, 2004) e a habilidade de agir como estimulador de células B (Rousset, 1993).

A secreção de IL-10 por macrófagos pode ser induzida pelo HIV ou por suas proteínas (Fauci, 1993; Takeshita, 1995; Muller, 1998; Barcova, 1998; Contreras, 2004). A IL-10 age como um potente cofator na proliferação e ativação das células B, além de aumentar a sobrevivência dos linfócitos B, protegendo-os da apoptose (Moore, 2001).

No contexto da infecção pelo HIV, os níveis de IL-10 aumentam progressivamente, em paralelo com a diminuição da contagem de células T CD4 e progressão para AIDS (Cleirici, 1994).

Altos níveis de IL-10 foram verificados em pacientes com linfoma não-Hodgkin relacionado à infecção pelo HIV, sugerindo o papel desta citocina na estimulação da proliferação dos linfócitos B (Blay, 1993; Edelman, 1996; Emilie, 1997). Proteínas virais como gp 41 (Barcova, 1998), Tat (Badou, 2000; Contreras, 2004) e Nef (Birgino, 1997) induzem a produção de IL-10 pelos macrófagos.

Em um estudo realizado por Fauci e colaboradores (1996), o tratamento de pacientes HIV positivos com uma única dose de IL-10 inibiu temporariamente a produção de TNF- $\alpha$  e IL-1 reduzindo os níveis de carga viral, *in vivo*. A IL-10 poderia ser benéfica na supressão da replicação viral, atuando como inibidora das citocinas pró-inflamatórias; contudo os altos níveis de IL-10 também podem estimular as células B, contribuindo para hiperatividade dessas células, observada nos pacientes HIV soropositivos (Fiorentino, 1991). Além disso, IL-10 participa da orientação da resposta Th2, ineficiente contra a infecção pelo HIV (Contreras, 2004).

A constante ativação imune e o fenótipo Th2 podem contribuir para os elevados níveis de apoptose, verificados nesses pacientes (Badley, 2000).

## **1.8 Apoptose**

A apoptose é uma forma fisiológica de morte celular que desempenha papel importante na manutenção da homeostasia dos tecidos, sendo essencial ao sistema imune no processo de seleção clonal e um importante mecanismo de defesa, eliminando células infectadas por vírus e células tumorais (Yuan, 2000).

As falhas no mecanismo de morte celular programada, com insuficiente morte celular, podem levar ao câncer, infecções virais persistentes e doenças autoimunes (Arnoult, 2003). No entanto, altos níveis de apoptose podem contribuir para a depleção do sistema imune celular, conforme verificado em pacientes imunocomprometidos, principalmente na infecção pelo HIV (Badley, 2000; Shi, 2002; Smaili, 2003).

A apoptose é caracterizada por contração da célula, condensação da cromatina, permeabilização da membrana citoplasmática com ativação de um processo endonucleolítico, o qual leva à clivagem do DNA e formação dos corpos apoptóticos que se tornam alvo para os fagócitos (Hengartner, 2000).

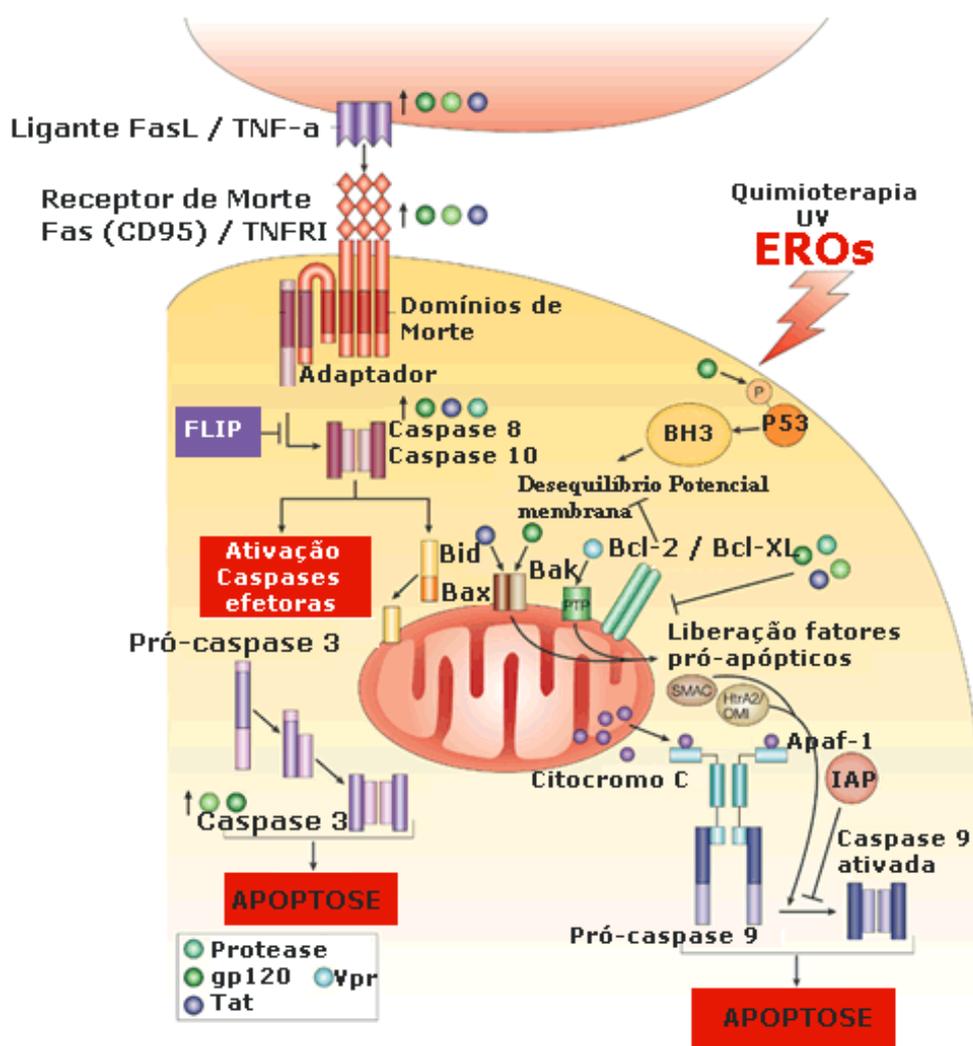
A apoptose apresenta três estágios: 1) Recepção de sinais intra e extra celulares iniciadores; 2) Morte celular devido a ativação das proteases intracelulares e 3) Remoção das células apoptóticas pelos fagócitos (Vaux, 1996; Savil, 2000).

Os estímulos internos e externos induzem a apoptose, geralmente envolvendo as caspases que são proteases específicas. Estas enzimas são sintetizadas como precursores inativos, ativados por clivagem proteolítica catalisada por outras caspases. Desta forma atuam em cascata degradando as proteínas celulares, culminando com o desarranjo do DNA cromossômico e morte celular (Nicholson, 1997; Lassus, 2002).

As caspases envolvidas na apoptose estão divididas em dois grupos: caspases iniciadoras, que incluem as caspases 2, 8, 9 e 10 e as caspases efetoras, que incluem as caspases 3, 6 e 7 (Budihardjo, 1999; Badley, 2000; Shi, 2002).

A apoptose pode ser mediada por receptores, sendo que os mais bem caracterizados atualmente são Fas (CD95) e TNFR I (Wu, 2002). Estes receptores se ligam às proteínas sinalizadoras Fas-L e TNF- $\alpha$ , respectivamente; essa ligação induz a trimerização do receptor e recrutamento dos domínios de morte intracelulares com ativação da enzima iniciadora caspase 8, que ativa a enzima efetora, a caspase 3, desencadeando a morte

celular (Figura 3) (Roumier, 2003). Fas é abundantemente expresso por linfócitos T ativados, infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) ou em células infectadas pelo HTLV-I, que causa leucemia e por células tumorais, que também expressam Fas (Wu, 1999; Lassus, 2002).



Adaptado de Gougeon, 2003.

### Figura 3: Vias de apoptose utilizadas pelo HIV.

A apoptose pode ser mediada por receptores, como Fas (CD95) e TNFR. Fas atua como receptor para FasL, expresso em linfócitos infectados pelo HIV. O TNF- $\alpha$ , cujos níveis estão elevados nos pacientes soropositivos, pode se ligar ao seu receptor e também desencadear apoptose. As EROs induzem a mudanças na mitocôndria que incluem aumento da permeabilidade com perda do potencial de membrana, ativação de genes pró-apoptóticos como Bax, Bid e Bak e a liberação de proteínas regulatórias como citocromo c, induzindo a apoptose. As células infectadas pelo HIV tornam-se alvo para os linfócitos T citotóxicos, que liberam perforina, uma proteína que abre canais na membrana plasmática, por onde entra a granzima B, uma serino protease que ativa diretamente as caspases 3, 6 e 7, induzindo apoptose. A enzima protease é capaz de clivar diretamente a caspase 8 e aumentar a susceptibilidade da célula à apoptose devido à degradação proteolítica da proteína antiapoptótica Bcl-2. As proteínas virais *Tat* e *Nef* aumentam a expressão de Fas na membrana das células infectadas, estimulando o mecanismo Fas/FasL. A proteína *Tat* também é capaz de inibir a enzima superóxido dismutase, tornando a mitocôndria mais suscetível às EROs.

Além do sistema receptor-ligante, outros estímulos como quimioterapia, radiação ultravioleta, radiação ionizante e as espécies reativas de oxigênio (EROs) induzem a mudanças na mitocôndria que incluem aumento da permeabilidade com perda do potencial de membrana, liberando proteínas regulatórias como citocromo *c*. Uma vez liberado no citoplasma, o citocromo *c* liga-se à Apaf-1 e este complexo, citocromo *c*/Apaf-1, ativa a enzima iniciadora caspase 9, que por sua vez ativa a caspase 3 desencadeando o processo de apoptose (Li, 1997; Green, 1998; Badley, 2000; Saleh, 2000; Shi, 2002; Smaili, 2003). No entanto, proteínas regulatórias pertencentes à família Bcl-2 que atuam na membrana mitocondrial para regular a integridade da mitocôndria e a liberação do citocromo *c*, são capazes de inibir a apoptose (Heiden, 1999).

Os membros da família Bcl-2, como Bcl-2 e Bcl-X<sub>L</sub> inibem a apoptose, pois previnem a liberação de citocromo *c* e são chamados de reguladores anti-apoptóticos; já Bax, Bid e Bak são proteínas pró-apoptóticas (Hengartner, 2000). Segundo Heiden (1999), a expressão de Bcl-2 é capaz de inibir a geração de EROs e a acidificação intracelular, bem como estabilizar o potencial de membrana da mitocôndria.

A atividade enzimática das caspases pode também ser regulada por uma família de proteínas inibidoras da apoptose ou IAPs (*Inhibitor of Apoptosis Protein*). As IAPs foram primeiramente isoladas do genoma do Baculovírus, com base na capacidade desse vírus em suprimir a apoptose nas células infectadas, através da inibição das caspases (Devereaux, 1999; Hay, 2000; Shi, 2002). Os alvos dessas proteínas são a caspase iniciadora, caspase 9 e as efetoras, caspases 3 e 7 (Shi, 2002).

Durante a apoptose as IAPs são removidas por uma proteína liberada da mitocôndria denominada smac/DIABLO ou segundo ativador das caspases derivado da mitocôndria (*second mitochondria-derived activator of caspases/ Direct IAP-Binding Protein with Low pI*) (Du, 2000; Verhagen, 2000). Após dano mitocondrial smac/DIABLO

é liberada do espaço intermembrana para o citoplasma, juntamente com o citocromo *c*. Enquanto citocromo *c* liga-se à Apaf-1 e ativa diretamente a caspase 9, smac/DIABLO remove as IAPs de sua ligação inibitória às caspases (Chai, 2000).

A família *c*-FLIP (*FLICE-like inhibitory protein* – proteína inibidora de FLICE) também atua regulando a apoptose; estas proteínas inibem a apoptose ligando-se ao FADD (*Fas Adaptor Death Domain*), uma proteína adaptadora ligada ao Fas, prevenindo assim a ativação da caspase 8/FLICE (Badley, 2000).

A regulação negativa da proliferação dos linfócitos T ocorre através da apoptose que inicia após a ativação dessas células. Após a ativação das células T, a expressão de *c*-FLIP diminui e as células tornam-se susceptíveis à morte celular via Fas/FasL e ativação da caspase 8 (Badley, 2000).

A apoptose também poder ser mediada pelos linfócitos T citotóxicos, que liberam perforina (Figura 3), uma proteína que abre canais na membrana citoplasmática permitindo a entrada de granzima B, uma serino protease que ativa diretamente as caspases 3, 7, 8 e 10 (Darmon, 1995; Saikumar, 1999; Trapani, 2002; Trambas, 2003).

### **1.8.1. Apoptose no Paciente HIV Soropositivo**

Os pacientes soropositivos para o HIV apresentam alterações qualitativas e quantitativas nas células T, com decréscimo na contagem de linfócitos T CD4 e inversão da relação CD4/CD8, sendo a contagem de células T CD4 um dos marcadores mais utilizados para avaliação da progressão da doença (Caggiari, 2000).

Além da produção destas células estar comprometida, existem evidências de que a depleção das células T periféricas se deve aos altos níveis de apoptose verificados nos pacientes infectados pelo HIV (Cotton, 1997; Prati, 1997; Gougeon, 2003).

A ativação imune crônica é o mecanismo primário envolvido na morte de células T em pacientes HIV soropositivos (Mahlknecht, 2000). Uma vez ativadas, as células T expressam receptores que sinalizam a apoptose, como Fas (CD95) e TNFR-I (Gougeon, 1996; Karmochkine, 1998). As células de pacientes HIV positivos e as células infectadas pelo HIV *in vitro* apresentam um aumento da expressão do CD95 na membrana celular e maior susceptibilidade à apoptose via Fas/FasL, bem como diminuição das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-X<sub>L</sub> e aumento concomitante das proteínas pró-apoptóticas Bcl<sub>XS</sub> e Bax (Badley, 2000).

A apoptose via TNFRs também está aumentada nos pacientes soropositivos para o HIV. A ligação entre o co-receptor CXCR4 e a proteína viral *Env* aumenta a expressão do TNFR-II pelas células T, tornando-as susceptíveis à apoptose pelo TNF de membrana expresso pelos macrófagos (De Oliveira Pinto, 2002). Os altos níveis plasmáticos de TNF, ligante para os TNFRs, detectados nos pacientes infectados pelo HIV sintomáticos, também contribuem para o aumento da apoptose. Segundo Gougeon (2003), os níveis de sTNFR-II (forma solúvel do TNFR-II) são preditivos de progressão para AIDS.

As proteínas virais pró-apoptóticas como *Tat*, *Nef*, *Vpr*, *gp120* e *gp41*, induzem apoptose através de mecanismos que incluem as vias receptor-ligante, formação de sincícios ou citotoxicidade direta (Castedo, 2001; Castedo 2002a; Wu, 2002).

A proteína viral *Tat* é capaz de ativar diretamente a caspase 8 e causar morte celular através do mecanismo Fas/FasL (Li, 1995; Gougeon, 1999); além disso, *Tat* é capaz de inibir a transcrição do gene da enzima superóxido dismutase e diminuir a expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2, tornando a mitocôndria vulnerável ao ataque por EROs (Badley, 2000).

*Nef*, uma proteína viral essencial para infectividade viral, responsável pela manutenção de altas taxas de vírus circulante, também está envolvida no aumento dos

níveis de apoptose via Fas/FasL (Turner, 1999). A proteína *Vpr* pode alterar o potencial de membrana da mitocôndria, mesmo em células não infectadas, ocasionando a liberação do citocromo *c*, desencadeando apoptose (Gougeon, 2003).

A protease viral é também capaz de clivar diretamente a caspase 8 e aumentar a susceptibilidade celular em decorrência da degradação proteolítica da proteína anti-apoptótica Bcl-2 (Badley, 2000).

O complexo glicoprotéico gp120/gp41 do envelope viral interage com os receptores CD4 induzindo ligações célula a célula, formando aglomerados celulares conhecidos como sincícios, que resultam em apoptose via mitocôndria (Chirmule, 1996; Ferri, 2000; Castedo, 2002b; Kroemer, 2002).

A disfunção das células T é uma característica da infecção pelo HIV. Conforme a infecção progride, as citocinas produzidas pelas células Th1 como IL-2 e INF- $\gamma$  diminuem, em detrimento de um aumento das citocinas liberadas pelas células Th2 como IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, que promovem a resposta imune humoral (Tangsinmankong, 2000). Segundo Badley (2000), a resistência à apoptose na infecção pelo SIV (vírus da imunodeficiência símia) e pelo HIV está associada com a predominância do fenótipo Th1, sendo que a ativação imune crônica e fenótipo Th2 podem promover a apoptose.

Sabe-se que a apoptose mediada pelo estresse oxidativo é uma das causas diretas de diminuição dos níveis de linfócitos T CD4 nos pacientes HIV positivos (Ameisen, 1991; Slatter, 1995), pois o estresse oxidativo causa mutações no DNA, danos à mitocôndria e ativação de genes pró-apoptóticos que podem desencadear a apoptose (Jaruga, 2002). Danos de extensão limitada aos cromossomos podem ser reparados pelas enzimas celulares, contudo, extensos danos ao DNA como ocasionados pelo estresse oxidativo, podem desencadear apoptose, reconhecidamente a maior causa do decréscimo na contagem de células T CD4 nos pacientes soropositivos para o HIV (Cooke, 1998).

Tendo em vista que condições pró-oxidantes podem aumentar os níveis de morte celular programada e facilitar a progressão da infecção para AIDS, o uso de antioxidantes pode ser benéfico nesses pacientes.

### **1.9 Estresse Oxidativo, Ascorbato e $\alpha$ -tocoferol**

Define-se estresse oxidativo como o desequilíbrio entre os sistemas pró-oxidante e antioxidante, no qual os níveis de geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) neutralizam as defesas antioxidantes endógenas do hospedeiro (Tang, 2000; Bulguer, 2001).

As EROs são produzidas em consequência de processos fisiológicos, como perda de elétrons das cadeias de transferência de elétrons celulares e como subprodutos do metabolismo de lipídios. Em situações de infecção, são produzidas pelas células fagocíticas como meio de destruir os microrganismos invasores (Evans, 2000; Bulguer, 2001), porém, quando o estímulo se torna constante e sistêmico como no caso da AIDS, a produção de EROs pode estar aumentada, resultando em um estado de estresse oxidativo e ocasionando efeitos tóxicos às células e tecidos (Frei, 1999).

Dentre as EROs incluem-se radicais hidroxila (OH), ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), dióxido de nitrogênio ( $NO_2$ ), bem como as espécies não radicalares como o ácido hidrocloroso (HOCl), o oxigênio *singlet* ( $^1O_2$ ), espécies nitrosadas ( $N_2O_3$ /  $N_2O_4$ ) e peroxinitrito (Cross, 1994; Carr, 1999).

O organismo possui um sistema de defesa antioxidante, incluindo enzimas como a glutatona (GSH), a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT), proteínas antioxidantes como ceruloplasmina, albumina, transferrina e haptoglobina, metabólitos como bilirrubina e urato, bem como antioxidantes de baixo peso molecular como o ascorbato (ascorbato), vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), carotenóides e flavonóides que são encontrados na dieta (Evans, 2000; Mollace, 2001).

Os seres humanos não sintetizam vitamina C e por isso necessitam obtê-la da dieta (Bánhegyi, 1997). A ingestão diária de ascorbato deve ser igual à quantidade excretada ou destruída pela oxidação, sendo que indivíduos adultos saudáveis perdem cerca de 3 a 4% de sua reserva corporal diariamente (Friedman, 1999).

As necessidades diárias de ascorbato em indivíduos saudáveis variam de 40 a 60 mg (Korolkovas, 2000). O ascorbato é rapidamente absorvido no intestino, por meio de um processo dependente de energia que é saturável e dose dependente. Quando a vitamina C é administrada em uma única dose oral, a absorção diminui de 75% com 1 grama para 20% com 5 gramas. A ligação à proteínas é baixa, apenas 25%. A vitamina C é eliminada na urina, a maior parte na forma de metabólitos. As concentrações plasmáticas variam de acordo com a ingestão; uma ingestão adequada, em indivíduos clinicamente saudáveis, está associada a concentrações superiores a 0,5 mg/dl (Hardman, 2003), enquanto em indivíduos infectados pelo HIV as concentrações de ascorbato são significativamente inferiores (Semba, 1999; Treitinger, 2000).

A vitamina C é um potente agente antioxidante, solúvel em água, com capacidade de proteger tanto os componentes do citoplasma como as membranas celulares. No citoplasma, o ascorbato age como um antioxidante direto, ou seja, como *scavenger* para os radicais livres gerados durante o metabolismo celular. Já nas membranas celulares, o ascorbato age como um antioxidante indireto, reduzindo o radical  $\alpha$ -tocoferil a  $\alpha$ -tocoferol (May, 1999), além de regenerar outros antioxidantes como glutatona, urato e  $\beta$ -caroteno (Carr, 1999).

O ascorbato também participa de funções imunológicas importantes como fagocitose, quimiotaxia e adesão dos neutrófilos, além de estar envolvido na regulação da síntese de citocinas (Jariwalla, 1996).

As necessidades diárias de vitamina E em indivíduos clinicamente saudáveis variam de 12-15 mg (Hardman, 2003). A concentração plasmática máxima de  $\alpha$ -tocoferol é atingida aproximadamente 12 horas após a administração, com uma meia vida de eliminação de 18 a 81 horas. Em indivíduos saudáveis, as concentrações plasmáticas de  $\alpha$ -tocoferol variam de 21 a 27  $\mu$ M (Schwedhelm, 2003), enquanto que em indivíduos infectados pelo HIV as concentrações de  $\alpha$ -tocoferol são significativamente inferiores (Allard, 1998a).

O caráter lipofílico do  $\alpha$ -tocoferol determina sua localização preferencial nas membranas celulares, onde funciona como quelante para o radical peroxil, prevenindo a propagação da cadeia oxidativa e dano às membranas celulares (Traber, 1995).

Independente de sua ação antioxidante, o  $\alpha$ -tocoferol atua sobre o sistema imune diminuindo a replicação do HIV através da regulação de processos como: i) diminuição dos níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , via inibição da via da 5-lipoxigenase; ii) diminuição dos níveis de outras citocinas como IL-4, IL-5 e IL-6, em modelo murino de AIDS; iii) modulação da produção de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>); níveis elevados de PGE<sub>2</sub> diminuem a produção de IL-2 e a ativação das células natural killer (NK); iv) inibição da interação entre endotélio e monócitos, através da regulação negativa de moléculas de adesão, como CD11b e VLA-4 (Azzi, 2000). Desta forma, a vitamina E é capaz de normalizar as alterações das funções do sistema imune observadas na infecção pelo HIV.

Os pacientes HIV soropositivos sofrem significativa amplificação na geração de EROs, especialmente no que tange a geração de O<sub>2</sub><sup>•</sup> (Gabilovitch, 1992; Jaruga, 2002). Observa-se também o aumento da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pelas células mononucleares, desde os estágios iniciais da infecção, mesmo nos pacientes assintomáticos, com contagens de linfócitos T CD4 > a 500 células/mm<sup>3</sup> (Elbim, 2001). Este fenômeno combinado com a

deficiência de enzimas antioxidantes como a SOD e a CAT e a diminuição dos níveis plasmáticos de vitaminas antioxidantes como vitamina E e vitamina C podem levar esses pacientes ao estresse oxidativo e progressão para AIDS (Jaruga, 2002; Gil, 2003).

Associados ao aumento da geração de EROs, fatores como diminuição da ingestão de nutrientes devido à perda de apetite (Bodgen, 2000) e alterações da mucosa gastrointestinal, com prejuízo na absorção dos micronutrientes, contribuem para a depleção das reservas antioxidantes e deficiências nutricionais, verificadas no paciente HIV soropositivo (Tang, 2000).

A suplementação vitamínica é capaz de reduzir a incidência de afecções como úlceras orais, esofagite por *Candida* e outras condições inflamatórias relacionadas à infecção pelo HIV (Lyn, 2000). Condições como náuseas, vômitos e diarreia também são menos frequentes nos pacientes que fazem uso de multivitaminas, em decorrência de seu efeito protetor sobre as mucosas oral e gastrointestinal, aumentando a imunidade local e sistêmica (Fawzi, 2004).

De acordo com Bodgen (2000), o estado nutricional está diretamente relacionado às funções do sistema imune, uma vez que as altas taxas de produção e renovação celular exigem altos níveis de nutrientes. As necessidades nutricionais são ainda maiores nos pacientes soropositivos para o HIV (Lyn, 2000), onde as taxas de destruição e renovação celular estão aumentadas (Gougeon, 2003).

Segundo Fawzi (2003), os pacientes HIV soropositivos que fazem uso de suplementação com multivitaminas, incluindo as vitaminas C e E, apresentam contagem de linfócitos T CD4 superiores às dos pacientes HIV soropositivos não suplementados e progressão mais lenta para AIDS.

As evidências de estresse oxidativo nesses pacientes podem ser demonstradas pelos baixos níveis plasmáticos de cisteína, glutatona, superóxido dismutase (SOD) (Jaruga,

2002), vitamina B<sub>6</sub> e B<sub>12</sub> (Sepulveda, 2002), vitamina E, vitamina A e C (Jaruga, 2002; Fawzi, 2004), desde os estágios iniciais da infecção. Estas deficiências estão envolvidas na patogênese da AIDS através do desenvolvimento de tumores relacionados ao HIV, indução precoce da apoptose nos linfócitos, aumento da replicação viral, e até mesmo altas taxas de mutações do HIV (Jaruga, 1999).

Nestes pacientes o aumento das condições pró-oxidantes está implicado na implementação da replicação viral, através da ativação do fator de transcrição nuclear NF- $\kappa$ B (Breenan, 1995; Lee, 1997; Gil, 2003).

A proteína ativadora -1 (AP-1) também pode ser ativada pelas EROs, sendo que vários genes pró-inflamatórios possuem sítios promotores para este fator de transcrição. Deste modo, alterações do estado redox da célula podem contribuir para a produção de citocinas inflamatórias, com inflamação sistêmica e dano aos órgãos (Bulguer, 2001). Em resposta à ativação imune crônica, as células do sistema imune, principalmente monócitos e macrófagos, produzem radicais livres que atuam estimulando a produção de citocinas, como TNF- $\alpha$ . Os altos níveis de TNF- $\alpha$ , por sua vez, estimulam a produção de mais radicais livres, gerando um ciclo vicioso que pode ser amplificado pela ocorrência de infecções oportunistas (Tang, 2000; Elbim, 2001).

Arnoult e colaboradores (2003) observaram aumento na produção de EROs em linfócitos T CD4 de indivíduos soropositivos para o HIV, quando comparados aos linfócitos CD4 em indivíduos soronegativos. O estresse oxidativo observado nesses pacientes pode ser decorrente, em parte, dos danos provocados ao DNA mitocondrial, visto que este não se encontra envolvido pelas histonas, como o DNA nuclear, e por isso está mais susceptível ao dano oxidativo (Cooke, 1998). As EROs danificam as proteínas e o DNA mitocondrial, desencadeando o processo de apoptose.

Em um estudo realizado por Campbell e colaboradores (1999), o ascorbato foi capaz de reduzir os níveis de morte celular na população de células T de ratos, o que sugere proteção contra a apoptose.

As EROs promovem danos ao DNA, através de modificações de bases e deleções. Os níveis de bases de DNA modificadas por oxidação estão significativamente aumentados em pacientes soropositivos para o HIV sintomáticos, quando comparados com indivíduos soronegativos (Jaruga, 1999). A modificação da base 8-hydroxiguanina (8-OH-Gua) apresenta-se em níveis elevados nos pacientes HIV soropositivos sintomáticos, enquanto apresenta-se em níveis normais em pacientes soronegativos para o HIV e pacientes HIV soropositivos assintomáticos (Jaruga, 2002). Estes dados fornecem evidências de que o aumento da produção de radicais livres e o conseqüente aumento do dano oxidativo, demonstrado pelas modificações de bases de DNA nos pacientes soropositivos para o HIV sintomáticos, contribuem para a progressão da doença.

Lutsenko (2002), estudando a função do ascorbato na manutenção da integridade do DNA celular, utilizou um sistema de avaliação de mutações nas bases de guanina. Neste estudo, verificou que as células suplementadas com ascorbato apresentavam redução significativa de mutações nas bases de guanina (8-oxo-dG), sugerindo que o ascorbato é capaz de prevenir mutações causadas pelo aumento da geração de EROs e com isso diminuir os níveis de apoptose, aumentados no paciente HIV soropositivo.

Estudos realizados por Harakeh e colaboradores (1991; 1994; 1997) demonstraram a atividade inibitória da vitamina C sobre a enzima viral transcriptase reversa, *in vitro*. Com base nestes resultados, os autores sugerem seu uso terapêutico para o controle da infecção pelo HIV.

Wang e colaboradores (1994), utilizando modelo de AIDS murina, avaliaram os efeitos da suplementação com altas doses de vitamina E sobre o sistema imune, produção

de citocinas e o estado nutricional e demonstraram o restabelecimento das concentrações séricas e teciduais, acompanhado da normalização da secreção de citocinas (IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6).

Estas observações sugerem que o uso de suplementação antioxidante pode ser benéfica nos pacientes infectados pelo HIV.

## 2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Os pacientes HIV soropositivos ou com AIDS apresentam um estado crônico de estresse oxidativo, com diminuição das reservas antioxidantes e conseqüente desequilíbrio do sistema oxidante/antioxidante. Os altos níveis de EROs estão associados com aumento da replicação viral e maior susceptibilidade dos linfócitos à apoptose, o que pode contribuir para a diminuição significativa dos linfócitos T CD4 observada nesses pacientes. Os baixos níveis dessas células de defesa são responsáveis pelas infecções oportunistas verificadas nos pacientes com AIDS e que podem levá-los a óbito.

Neste contexto, a reconstituição dos níveis séricos de antioxidantes, como ascorbato e  $\alpha$ -tocoferol, pode ser um recurso importante na manutenção e recuperação da viabilidade celular, bem como apresentar efeito inibidor da replicação viral.

### Objetivo Geral

O objetivo geral deste estudo foi avaliar o efeito do ascorbato e do  $\alpha$ -tocoferol sobre a viabilidade celular e a evolução da infecção pelo HIV através dos parâmetros laboratoriais marcadores do processo infeccioso.

### Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito do ascorbato e do  $\alpha$ -tocoferol sobre a viabilidade celular de linfócitos, através da realização do ensaio de viabilidade celular em linfócitos periféricos;
- Avaliar o potencial antirretroviral do ascorbato e do  $\alpha$ -tocoferol, em associação com a TARV, através da determinação dos níveis plasmáticos de RNA do HIV;
- Avaliar o efeito da suplementação com ascorbato e do  $\alpha$ -tocoferol sobre a evolução da infecção pelo HIV, através da determinação dos marcadores de progressão CD4, CD8 e RNA do HIV;

- Avaliar o efeito do ascorbato e do  $\alpha$ -tocoferol no ritmo de progressão da infecção, através da avaliação dos marcadores de valor prognóstico IgG, IgA, IgM e  $\beta$ 2-microglobulina.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Casuística**

Participaram deste estudo 67 voluntários comprovadamente soropositivos para o HIV, diagnosticados por dois testes sorológicos tipo ELISA, com princípios metodológicos distintos e confirmados por imunofluorescência indireta, com indicação para o início da terapia antirretroviral, conforme orientações do Ministério da Saúde (Ministério da Saúde, 2004).

Após triagem clínica realizada por médicos infectologistas do ambulatório de DST/AIDS do Centro de Saúde II – Secretaria Municipal da Saúde de Florianópolis, os pacientes devidamente esclarecidos e que aceitaram participar da pesquisa mediante assinatura de um termo de compromisso (Anexo 1), foram encaminhados ao Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina, para a coleta de material biológico para as determinações laboratoriais.

A realização deste estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina, conforme consta do processo nº 026/99, cujo parecer encontra-se em anexo (Anexo 2).

Os 47 pacientes que concluíram sua participação neste estudo, 32 homens e 15 mulheres, foram submetidos à terapia antirretroviral conforme a Tabela 1. Os demais foram excluídos por motivos como gravidez, abandono do tratamento e falha terapêutica devido à falta de adesão à terapia antirretroviral.

**Tabela 1. Protocolos de terapia antirretroviral a que foram submetidos os pacientes participantes do estudo.**

<b>Terapia Antirretroviral</b>	<b>Grupo Controle N = 20</b>	<b>Grupo Ascorbato N = 13</b>	<b>Grupo <math>\alpha</math>-tocoferol N = 14</b>
AZT + 3TC + NVP	8	3	6
AZT + 3TC + NFV	-	1	-
AZT + ddI + NVP	2	-	4
AZT + 3TC + ddI	1	-	-
AZT + 3TC	2	-	1
AZT + 3TC + IDV	2	-	2
ddI + 3TC + NFV	-	-	1
AZT + 3TC + EFZ	-	7	-
D4T + 3TC + AZT	-	1	-
D4T + 3TC + EFZ	-	1	-

N = número de pacientes; AZT = Zidovudina; 3TC = Lamivudina; ddI = Didanosina; D4T= Estavudina NVP = Nevirapina; NFV = Nelfinavir; IDV = Indinavir; EFZ= Efavirenz

As amostras de sangue venoso foram coletadas por punção antero-cubital, pela manhã, após jejum de 12 horas, utilizando-se sistema de coleta a vácuo.

Foram coletados 10 mililitros de sangue em tubo contendo heparina para a realização da cultura de células e ensaio de viabilidade celular, 6 mililitros de sangue sem anticoagulante para a determinação das imunoglobulinas, IgA, IgG e IgM e  $\beta_2$ -microglobulina, e 8 mililitros de sangue contendo EDTA para a determinação dos níveis plasmáticos de RNA do HIV, contagem de células CD4 e CD8.

Os pacientes participantes do estudo foram divididos em três grupos, de acordo com o tratamento suplementar administrado, sendo um grupo Controle (21 - 40 anos) fazendo uso de placebo + TARV, um grupo suplementado fazendo uso de ascorbato + TARV (20 - 42 anos) e um grupo suplementado fazendo uso de  $\alpha$ -tocoferol + TARV (22 - 36 anos).

Após a coleta, os pacientes pertencentes ao Grupo Controle foram orientados a iniciar o tratamento antirretroviral de acordo com as ordens médicas e placebo.

Os pacientes pertencentes aos Grupos suplementados foram orientados a iniciar o tratamento antirretroviral seguindo as ordens médicas, bem como a terapia suplementar com ascorbato ou terapia antirretroviral com  $\alpha$ -tocoferol. O grupo suplementado com ascorbato recebeu 2 gramas diárias de ascorbato, na forma de 4 comprimidos de liberação prolongada de 500 mg, ingeridos de 6 em 6 horas (*Sanofy-Synthelabo, RJ*), enquanto o grupo suplementado com  $\alpha$ -tocoferol recebeu 800 mg/dia de  $\alpha$ -tocoferol (*E-Radicaps®*), em duas administrações de 400 mg pela manhã e à noite (*Novaquin-Sigma*).

Utilizou-se o modelo de estudo duplo-cego e placebo controlado.

Todos os pacientes foram avaliados nos tempos 0 (zero), 60, 120 e 180 dias após o início dos tratamentos.

### **3.2 Isolamento das Células Mononucleares**

O sangue contendo heparina foi centrifugado a 378 g por 10 minutos e a camada de glóbulos brancos formada entre o plasma e as hemácias foi removida com a utilização de uma pipeta de Pasteur e ressuspendida em 5 mililitros de solução fisiológica tamponada com fosfato (PBS) em pH 7,4.

Esta suspensão de células foi delicadamente transferida para um tubo contendo 2 mililitros de Ficoll-paque®, densidade 1,077 (*Sigma Chemical Company, Saint Louis, USA*) e centrifugado a 378 g por 20 minutos.

A camada de células localizada entre o PBS e o Ficoll-paque foi retirada com pipeta de Pasteur, lavada 2 vezes com PBS pH 7,4 e sedimentada por centrifugação a 168 g por 5 minutos.

Estas células foram ressuspensas em meio RPMI 1640 (*Sigma Chemical Company, Saint Louis, USA*), suplementadas com 10% de soro bovino fetal inativado, 10 µg/ml de estreptomicina e 2,5 µg/ml de anfotericina B e mantidas por 48 horas a 37°C, em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>.

### 3.3 Ensaio de Viabilidade Celular

O ensaio de viabilidade celular foi realizado no Setor de Citometria de Fluxo do Laboratório Médico Santa Luzia de Florianópolis.

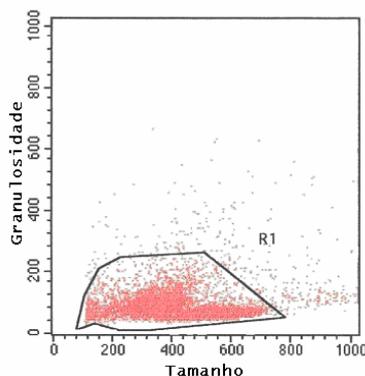
A quantificação das células viáveis, mortas e apoptóticas foi realizada por citometria de fluxo, utilizando para isso dois corantes de ácidos nucleicos, a calceína e o homodímero 1 de etídio (EthD-1), através do conjunto reativo LIVE/DEAD™ (*Molecular Probes Incorporation, Eugene, Oregon, USA*).

As células mantidas em meio RPMI 1640 por 48 horas foram ressuspensas e transferidas para um tubo de citômetro e sedimentadas por centrifugação (168 g/ 5 minutos); o sobrenadante foi desprezado com o auxílio de agulha de Pasteur e as células ressuspensas em 200 µl de solução corante (calceína 1µM, EthD-1 8 µM em solução de PBS pH 7,4) e mantidas em repouso ao abrigo da luz por 15 minutos.

Posteriormente, o ensaio foi realizado em citômetro de fluxo modelo FACSCallibur (*Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, C.A., USA*), com o uso de dois programas próprios para análises imunofenotípicas, CELLQuest e PAINT-A-GATE, que permitem a aquisição das células mononucleares, a visualização da distribuição gráfica dos linfócitos corados, bem como a porcentagem de células viáveis, mortas e em apoptose.

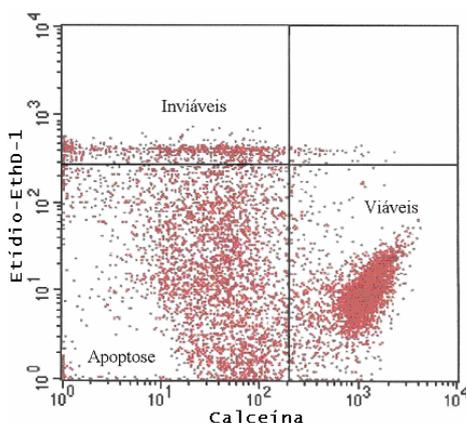
Como pode ser observado na Figura 4, no programa CELLQuest realiza-se a seleção das células de acordo com seu tamanho e granulosidade, excluindo-se células

maiores como os monócitos e células que apresentam granulações, como os segmentados remanescentes da separação com Ficoll-paque®.



**Figura 4:** Seleção das células mononucleares no programa CELLQuest pelo tamanho e granulosidade.

No programa PAINT-A-GATE, pode-se observar três populações celulares distintas. As células viáveis que constituem o grupo de células do quadrante inferior direito, marcadas intensamente com calceína; as células mortas encontradas nos quadrantes superiores, intensamente marcadas com EthD-1 e uma população intermediária, localizada no quadrante inferior esquerdo, constituindo as células em apoptose (Figura 5).

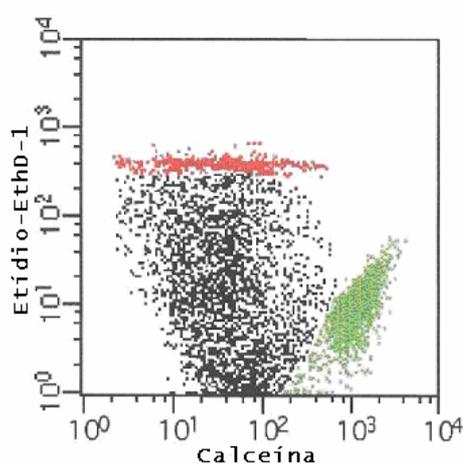


**Figura 5:** Visualização das três populações celulares de acordo com a emissão de fluorescência no programa CELLQuest.

As células viáveis são permeáveis à calceína, que sofre ação enzimática de esterases celulares, convertendo-se em calceína intensamente fluorescente.

As células mortas sem atividade de esterases são permeáveis ao brometo de etídio, que se liga ao ácido nucléico emitindo fluorescência, sendo que as células em apoptose com pouca atividade de esterases e pouco permeáveis ao EthD-1 também emitem fluorescência.

Deste modo, as células viáveis emitem fluorescência verde, devido à calceína; as células mortas emitem fluorescência vermelha, em função do brometo de etídio, e as células em apoptose emitem um misto de fluorescência verde e vermelha (Figura 6).



**Figura 6: Visualização gráfica das células viáveis, mortas e em apoptose através do programa PAINT-A-GATE.**

O resultado final é dado em porcentagem de células viáveis, mortas e em apoptose.

<span style="color: red;">■</span>	8,16%	Eventos em vermelho
<span style="color: green;">■</span>	59,12%	Eventos em verde
<span style="color: yellow;">■</span>	0,0%	Eventos em amarelo
<span style="color: purple;">■</span>	0,0%	Eventos em violeta
<span style="color: cyan;">■</span>	0,0%	Eventos em azul claro
<span style="color: black;">■</span>	32,72%	Eventos em preto
<span style="color: gray;">■</span>	0,0%	Eventos não classificados

**Figura 7: Resultado final da avaliação da viabilidade celular de linfócitos.**

### 3.4 Contagem de Linfócitos T CD4 e T CD8

A contagem de linfócitos T CD4 e T CD8 foi realizada no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário – Universidade Federal de Santa Catarina.

A contagem de linfócitos T CD4 e T CD8 foi realizada através de citômetro de fluxo modelo FACSCount™ (*Becton Dickinson, USA*), em amostras de sangue total, utilizando o conjunto reativo com anticorpos monoclonais anti CD4/CD3 e anti CD8/CD3 (*Becton Dickinson, San Jose, C.A., USA*).

Os valores de referência assumidos para a contagem de linfócitos CD4 e CD8 foram os seguintes:

CD4: 500 a 1500 céls/mm<sup>3</sup>

CD8: 300 a 1000 céls/mm<sup>3</sup>

A relação CD4/CD8 foi obtida pela divisão do número de linfócitos CD4 pelo número de linfócitos CD8. Para calibração do sistema foram utilizados os conjuntos FACSCount™ Control (*Becton Dickinson*), que contém os controles: zero, baixo, médio e alto.

### 3.5 Quantificação do RNA do HIV

A quantificação do RNA viral (Carga Viral) foi realizado por metodologia NASBA (*Nucleic Acid Sequence-based Amplification*) através do teste NucliSens HIV-1 QT, Organon Teknika BV (*Boxtel, Netherland*), onde o DNA é extraído, amplificado e quantificado por eletroquimiluminescência.

As determinações foram realizadas a partir de sangue total coletado em tubo contendo EDTA, este foi centrifugado a 378 g por 10 minutos para obtenção do plasma.

O NucliSens HIV-1 QT compreende quatro conjuntos reativos distintos, sendo um para cada fase de execução do teste:

1. *NucliSens Lysis Buffer*, utilizado para a liberação dos ácidos nucleicos;

2. *NucliSens HIV QT*, para isolamento dos ácidos nucléicos;
3. *NucliSens HIV QT*, para amplificação dos ácidos nucléicos;
4. *NucliSens HIV QT*, para detecção dos ácidos nucléicos.

O teste NucliSens HIV-1 QT consiste das seguintes etapas:

- **Liberação dos ácidos nucléicos:** 1 ml do plasma obtido foi adicionado ao tampão de lise (Tiocianato de guanidina) para liberação dos ácidos nucléicos e posterior determinação. Esta etapa tem por finalidade a desintegração das partículas virais e células, bem como a inativação das RNAses e DNAses presentes na amostra.

- **Isolamento dos ácidos nucléicos:** aos ácidos nucléicos liberados no tampão de lise, são adicionados três RNAs sintéticos de concentração conhecida (Qa, Qb e Qc), alta, média e baixa, respectivamente, que servem como calibradores internos. Cada um desses RNAs difere do RNA do HIV presente na amostra em apenas uma seqüência de pares de bases. Em meio de elevada concentração salina os ácidos nucléicos presentes no tampão, incluindo-se os calibradores, ligam-se às partículas de dióxido de silício que funcionam como base sólida. Em seguida os ácidos nucléicos são eluídos da fase sólida utilizando-se tampão de eluição.

- **Amplificação:** o RNA do HIV-1 presente no eluído é amplificado juntamente com os calibradores internos. Cada cópia formada entra em um novo ciclo de amplificação, sendo que esta metodologia não requer a separação das cadeias, tornando o processo isotérmico e contínuo.

- **Detecção:** a detecção e quantificação do RNA do HIV-1 presente na amostra se baseia no princípio de eletroquimiluminescência, utilizando o leitor NucliSens Reader. Aliquotas da amostra são adicionadas a quatro soluções de hibridização específicas (WT, Qa, Qb e Qc). Os RNAs são hibridizados com esferas-oligo (um oligo ligado a esferas revestidas com estreptavidina) e uma sonda marcada com rutênio. As esferas

paramagnéticas ligadas ao complexo RNA/sonda são capturadas à superfície de um eletrodo por meio de um campo magnético. A voltagem aplicada ao eletrodo desencadeia a reação de eletroquimiluminescência, sendo que a luz emitida pelas sondas marcadas com rutênio é proporcional à quantidade de RNA viral amplificado.

### **3.8 Determinação dos Níveis Séricos das Imunoglobulinas**

Os níveis séricos de IgA, IgG e IgM foram determinados por Nefelometria, utilizando-se anticorpos específicos produzidos pela *Beckman Instruments Inc., USA.*, e analisados em analisador automático modelo Array 360 System também produzido pela *Beckman Instruments Inc., USA.*, no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário - UFSC.

Valores de referência:

IgA: 100 a 490 mg/dl

IgG: 694 a 1618 mg/dl

IgM: 60 a 263 mg/dl

### **3.7 Determinação dos Níveis Séricos de $\beta$ 2-Microglobulina**

Os níveis séricos de  $\beta$ 2-microglobulina foram determinados através de ensaio enzimático imunométrico quimiluminescente de fase sólida, utilizando conjuntos reativos IMMULITE® (*Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, USA*), no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário - UFSC.

Os valores de referência para este analito são:

1.010 a 1.730 ng/dl

#### **4 INFERÊNCIA ESTATÍSTICA**

Os resultados das variáveis avaliadas neste estudo são expressos através da média aritmética e desvio padrão, sendo as variáveis avaliadas intra e inter grupos. As análises intra grupo foram realizadas por análise de contrastes ortogonais: contraste de repetição, contraste de diferença e contraste de Helmert. Na análise inter grupos, o efeito dos tratamentos ao longo do tempo foi avaliado através de Análise de Variância Multivariada de Medidas repetidas, com os testes de Pillai's, Lambda de Wilk's, Hotelling's e Roy's, considerando o fator tempo e a interação entre os fatores tempo e tratamento. As análises foram realizadas utilizando-se o programa SPSS©, versão 11.5.

## 5 RESULTADOS

### 5.2 Níveis plasmáticos de RNA do HIV-1

As médias dos níveis plasmáticos de RNA do HIV apresentaram diminuição significativa em consequência do tempo de tratamento, nos três grupos estudados, em decorrência do uso da terapia antirretroviral ( $p = 0,0001$ ) (Tabela 2).

**Tabela 2. Níveis plasmáticos de RNA do HIV-1 (cópias/ml), nos tempos 0, 60, 120 e 180 dias, nos grupos suplementados e controle.**

		Tempo (dias)			
		0	60	120	180
Controle N = 20	Média*	133.460 <sup>a</sup>	3.168 <sup>b</sup>	2.769 <sup>b</sup>	61,95 <sup>b</sup>
	Desvio Padrão	170.846,824	3.725,448	9.297,999	22.142,26
	Mínimo	2.700	80	80	80
	Máximo	720.000	12.000	42.000	100.000
Ascorbato N = 13	Média	149.107,69 <sup>a</sup>	16.555,4 <sup>b</sup>	8.245 <sup>b</sup>	28.274,2 <sup>b</sup>
	Desvio Padrão	177.956,50	49.410,93	18.209,24	57.908,90
	Mínimo	3.400	80	80	80
	Máximo	520.000	180.000	61.000	190.000
$\alpha$ -tocoferol N = 14	Média	113.428,57 <sup>a</sup>	4.322,14 <sup>b</sup>	1.975 <sup>b</sup>	1.299,29 <sup>b</sup>
	Desvio Padrão	78.418,713	7.171,31	3.618,83	2.395,57
	Mínimo	25.000	480	80	80
	Máximo	310.000	28.000	14.000	9.000

Efeito do fator tempo:  $p = 0,0001$

Interação entre os fatores tempo e tratamentos:  $p = 0,965$

\* Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as médias, ao nível de significância de  $p < 0.05$

N = Número de pacientes estudados

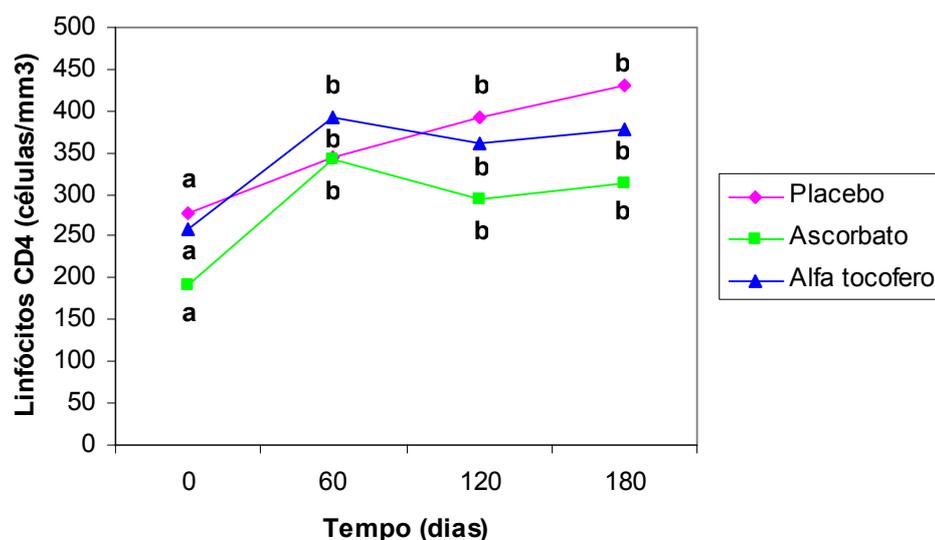
Os grupos suplementados com ascorbato e  $\alpha$ -tocoferol apresentaram, aos 60 dias de tratamento, níveis médios inferiores aos verificados no início do tratamento ( $p=0,0001$ ) (Tabela 2). As médias de RNA do HIV, observadas aos 120 e 180 dias de tratamento, foram semelhantes às observadas no grupo controle.

Não foram observados efeitos adicionais da suplementação com ascorbato e  $\alpha$ -tocoferol, nas concentrações utilizadas neste estudo, com relação à diminuição dos níveis plasmáticos de RNA do HIV ( $p=0,539$ ).

### 5.3 Número de linfócitos CD4

A média das determinações do número de linfócitos CD4 apresentou aumento significativo em função do tempo de tratamento ( $p=0,0001$ ).

Os pacientes pertencentes aos três grupos avaliados apresentaram, aos 60 dias de tratamento, aumento das médias da contagem de linfócitos CD4, em relação às médias basais, seguido de um período de estabilização até o final do período de estudo (Figura 8).



**Figura 8.** Linfócitos CD4 (células/mm<sup>3</sup>) nos tempos 0, 60, 120 e 180 dias após o início do tratamento, nos grupos controle e suplementados.

Efeito do fator tempo:  $p=0,0001$

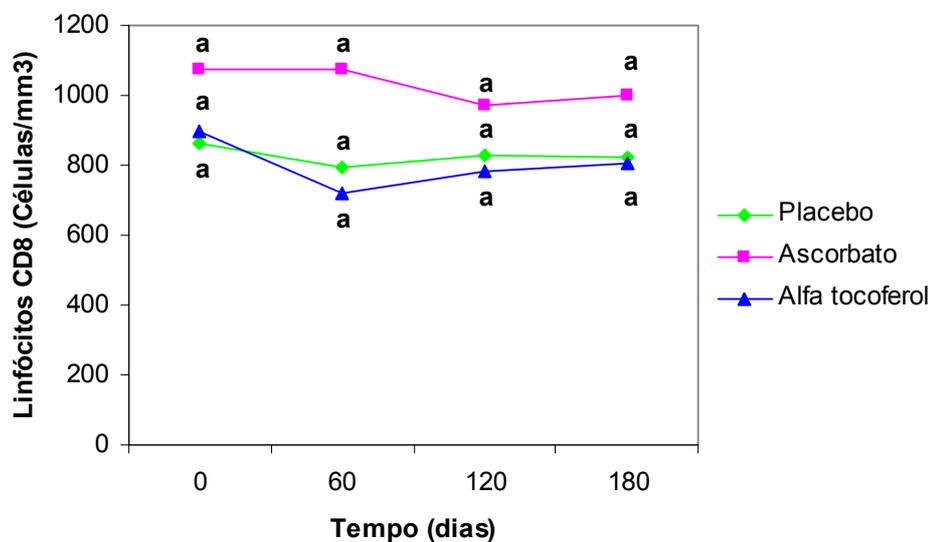
Interação entre os fatores tempo e tratamentos:  $p=0,842$

Letras diferentes indicam diferenças significativas,  $p < 0.05$ .

Não foram observados efeitos adicionais da suplementação com ascorbato ou  $\alpha$ -tocoferol, sobre os níveis de linfócitos CD4, nas concentrações utilizadas neste estudo ( $p=0,842$ ) (Figura 8).

#### 5.4 Número de linfócitos CD8

As médias das determinações de linfócitos CD8, aos 60, 120 e 180 dias não apresentaram diferenças significativas em função do tempo de tratamento, quando comparadas às médias dos níveis séricos basais destas células, nos grupos controle, ascorbato e  $\alpha$ -tocoferol ( $p= 0,109$ ) (Figura 9).



**Figura 9.** Linfócitos CD8 (células/mm<sup>3</sup>) nos tempos 0, 60, 120 e 180 dias após o início do tratamento, nos grupos controle e suplementados.

Efeito do fator tempo:  $p=0,109$

Interação entre os fatores tempo e tratamentos:  $p=0,584$

Letras diferentes indicam diferenças significativas,  $p < 0.05$ .

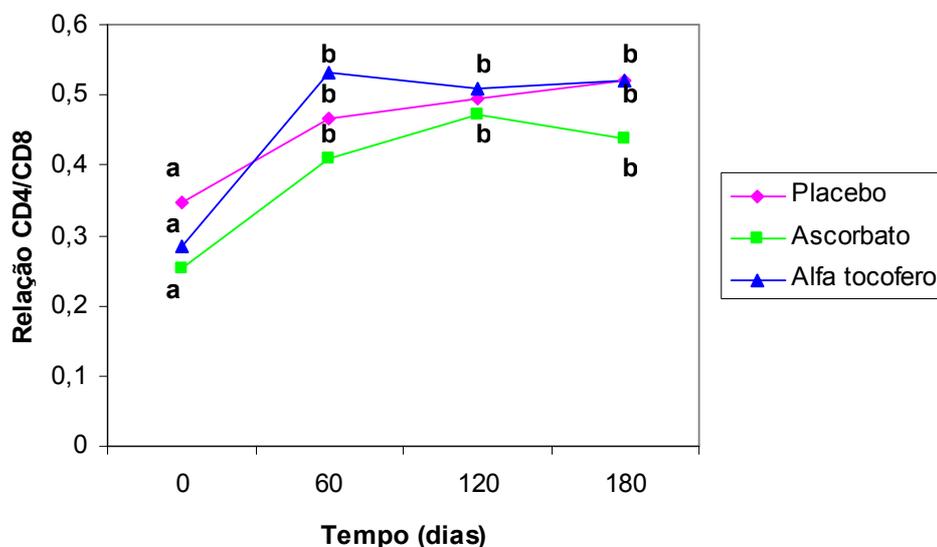
Não foram observados efeitos adicionais da suplementação antioxidante sobre os níveis de linfócitos CD8, durante o período de estudo ( $p=0,584$ ) (Figura 9).

### 5.5 Relação entre o número de linfócitos CD4 e CD8

A relação entre o número de linfócitos CD4 e CD8 apresentou aumento significativo em função do tempo de tratamento, nos três grupos estudados ( $p=0,0001$ ), sem apresentar diferenças entre os tratamentos avaliados ( $p=0,491$ ). Os três grupos apresentaram, aos 60 dias de tratamento, aumento das médias da relação CD4/CD8, em comparação com as respectivas médias basais.

Aos 120 e 180 dias de tratamento não se observaram diferenças significativas das médias em relação às médias verificadas aos 60 dias de tratamento (Figura 10).

Não foram observados efeitos adicionais da suplementação antioxidante, com ascorbato e  $\alpha$ -tocoferol, sobre a relação CD4/CD8, ao longo do tempo ( $p=0,954$ ) (Figura 10).



**Figura 10.** Relação CD4/CD8 nos tempos 0, 60, 120 e 180 dias após o início do tratamento, nos grupos controle e suplementados.

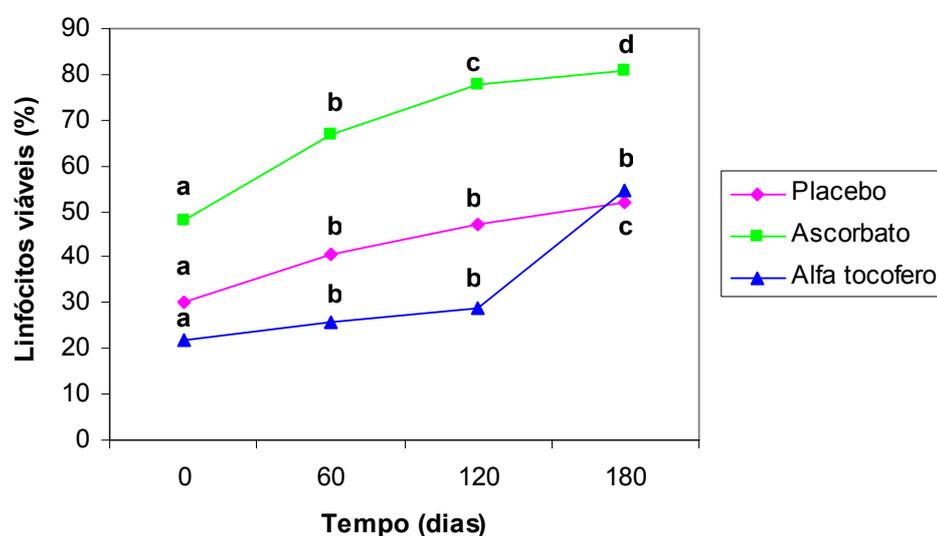
Efeito do fator tempo:  $p= 0,0001$

Interação entre os fatores tempo e tratamentos:  $p=0,954$

Letras diferentes indicam diferenças significativas,  $p < 0.05$ .

### 5.6 Percentual de linfócitos vivos

O percentual de linfócitos vivos apresentou aumento significativo em consequência do tempo de tratamento, nos três grupos estudados ( $p=0,0001$ ). O grupo controle apresentou, aos 60 dias, aumento significativo do percentual de linfócitos viáveis em relação aos níveis basais, contudo, aos 120 e 180 dias de tratamento, não houve diferença significativa dos níveis de viabilidade celular com relação às médias observadas aos 60 dias de tratamento.



**Figura 11.** Linfócitos viáveis (%) nos tempos 0, 60, 120 e 180 dias após o início do tratamento, nos grupos controle e suplementados.

Efeito do fator tempo:  $p=0,0001$

Interação entre os fatores tempo e tratamentos:  $p=0,002$

Letras diferentes indicam diferenças significativas,  $p < 0.05$ .

Aos 180 dias, observa-se um aumento da porcentagem de linfócitos viáveis no grupo suplementado com  $\alpha$ -tocoferol, quando comparado aos tempos 0, 60 e 120 dias de tratamento ( $p=0,002$ ) (Figura 11).

O grupo suplementado com ascorbato apresentou, aos 60 dias de tratamento, aumento dos níveis de linfócitos viáveis, quando comparado às médias dos níveis basais de

viabilidade celular. Aos 120 e 180 dias de tratamento, observa-se aumento significativo das médias de viabilidade celular, quando comparadas às médias dos níveis basais e aos 60 dias de tratamento (Figura 11).

### 5.7 Percentual de linfócitos em apoptose

O percentual de linfócitos em apoptose apresentou diminuição significativa em consequência do tempo de tratamento, nos três grupos estudados ( $p=0,0001$ ).

No grupo controle, aos 120 dias de tratamento, verificou-se diminuição das médias da porcentagem de linfócitos em apoptose, seguido de estabilização até o final do período de estudo.

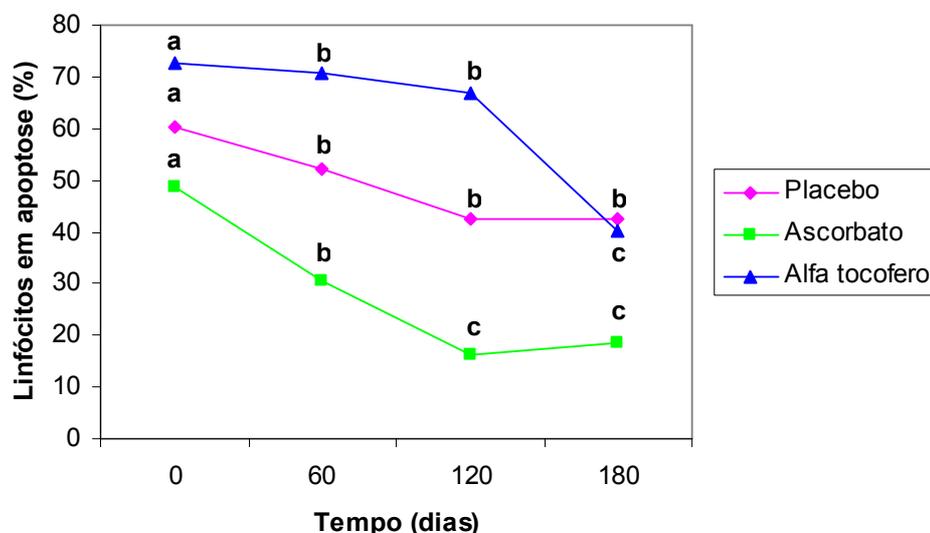


Figura 12. Linfócitos em apoptose (%) nos tempos 0, 60, 120 e 180 dias após o início do tratamento, nos grupos controle e suplementados.

Efeito do fator tempo:  $p=0,0001$

Interação entre os fatores tempo e tratamentos:  $p=0,0001$

Letras diferentes indicam diferenças significativas,  $p < 0.05$ .

O grupo suplementado com ascorbato apresentou, aos 60 dias de tratamento, diminuição dos níveis de apoptose, quando comparados aos níveis basais ( $p=0,0001$ ), o

efeito adicional da terapia suplementar com ascorbato observado a partir dos 120 dias de tratamento e mantido até o final do período observado (Figura 12).

No grupo suplementado com  $\alpha$ -tocoferol observa-se diminuição significativa dos níveis de apoptose aos 180 dias de tratamento, com relação às médias basais, demonstrando o efeito adicional da suplementação com  $\alpha$ -tocoferol. No entanto, aos 60 e 120 dias de tratamento, as médias não apresentam diferenças comparadas aos níveis iniciais de apoptose nos linfócitos (Figura 12).

### 5.8 Percentual de linfócitos Inviáveis

As médias dos linfócitos mortos apresentaram diferença significativa ao longo do tempo de tratamento, nos três grupos estudados ( $p=0,04$ ).

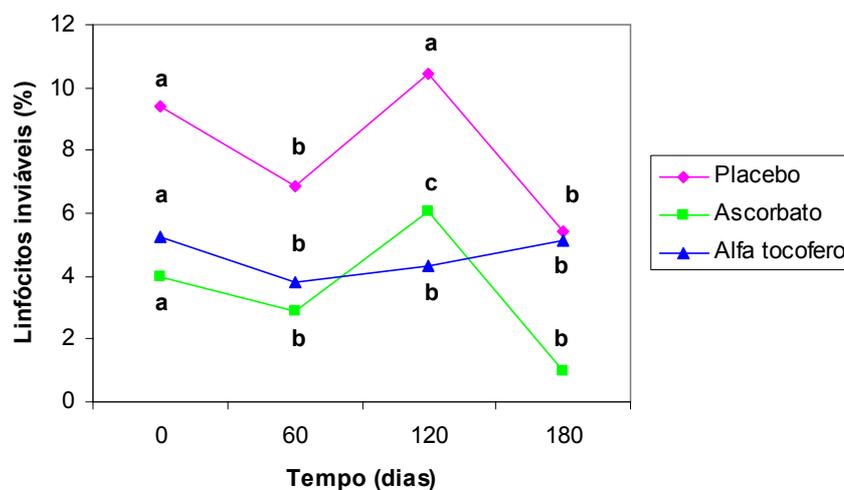


Figura 13. Linfócitos inviáveis (%) nos tempos 0, 60, 120 e 180 dias após o início do tratamento, nos grupos controle e suplementados.

Efeito do fator tempo:  $p=0,04$

Interação entre os fatores tempo e tratamentos:  $p=0,125$

Letras diferentes indicam diferenças significativas,  $p < 0.05$ .

Os três grupos avaliados apresentaram flutuações nas médias dos níveis de linfócitos mortos, ao longo do período avaliado (Figura 13).

Não foram observados efeitos adicionais da suplementação com ascorbato ou  $\alpha$ -tocoferol, na diminuição dos níveis de linfócitos mortos ( $p=0,125$ ).

### 5.9 Níveis séricos de IgA, IgG e IgM

Os níveis séricos de IgA, IgG e IgM apresentaram diminuição significativa em consequência do tempo de tratamento ( $p=0,0001$ ;  $p=0,0001$ ;  $p=0,0001$ ) (Figuras 14, 15 e 16).

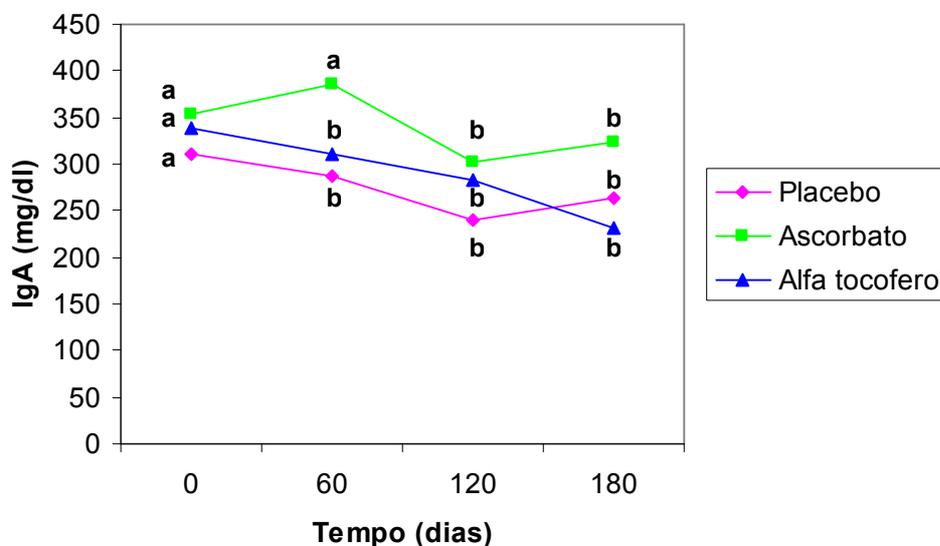


Figura 14. Níveis séricos de IgA (mg/dl) nos tempos 0, 60, 120 e 180 dias após o início do tratamento, nos grupos controle e suplementados.

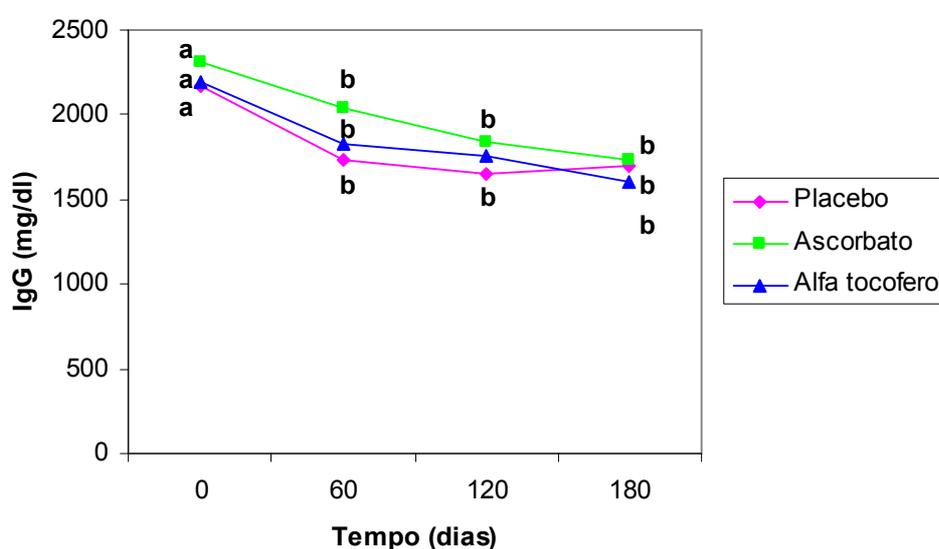
Efeito do fator tempo:  $p=0,002$

Interação entre os fatores tempo e tratamentos:  $p=0,490$

Letras diferentes indicam diferenças significativas,  $p < 0.05$ .

Os níveis séricos de IgA nos grupos controle e suplementado com  $\alpha$ -tocoferol, aos 60 dias de tratamento, apresentaram diminuição significativa com relação aos níveis basais. Aos 120 dias de tratamento, os níveis basais de IgA não foram diferentes dos

observados aos 60 dias de tratamento, para os grupos controle e  $\alpha$ -tocoferol; neste mesmo tempo, o grupo suplementado com ascorbato apresentou diminuição dos níveis séricos de IgA, semelhante à observada para os grupos controle e  $\alpha$ -tocoferol aos 60 dias de tratamento. No grupo suplementado com ascorbato, aos 60 dias de tratamento, observa-se aumento dos níveis séricos de IgA, com relação aos níveis basais, contudo, esse aumento não apresenta diferença estatística (Figura 14).



**Figura 15.** Níveis séricos de IgG (mg/dl) nos tempos 0, 60, 120 e 180 dias após o início do tratamento, nos grupos controle e suplementados.

Efeito do fator tempo:  $p=0,0001$

Interação entre os fatores tempo e tratamentos:  $p=0,567$

Letras diferentes indicam diferenças significativas,  $p < 0.05$ .

O grupo suplementado com  $\alpha$ -tocoferol, aos 180 dias de tratamento, apresentou diminuição mais pronunciada dos níveis séricos de IgA, porém essa diminuição não apresentou diferença estatística (Figura 14) ( $p=0,645$ ).

Não foram observados efeitos adicionais da suplementação com ascorbato ou  $\alpha$ -tocoferol sobre a diminuição dos níveis de séricos de IgA, durante o período de estudo ( $p=0,490$ ).

Nos grupos controle e  $\alpha$ -tocoferol, aos 60 dias de tratamento, os níveis séricos de IgG e IgM apresentaram diminuição significativa com relação aos níveis séricos basais ( $p=0,0001$ ), seguido de estabilização até o final do período de estudo (Figuras 15 e 16).

O grupo suplementado com ascorbato, da mesma forma que os grupos controle e  $\alpha$ -tocoferol, apresentou diminuição significativa dos níveis séricos de IgG e IgM, aos 60 dias de tratamento, quando comparados aos níveis basais dessas imunoglobulinas. Neste grupo, observa-se diminuição acentuada dos níveis séricos de IgM aos 180 dias de tratamento, com relação aos níveis basais e após 60 e 120 dias de tratamento, porém não existe diferença estatística entre as médias ( $p=0,367$ ) (Figura 16).

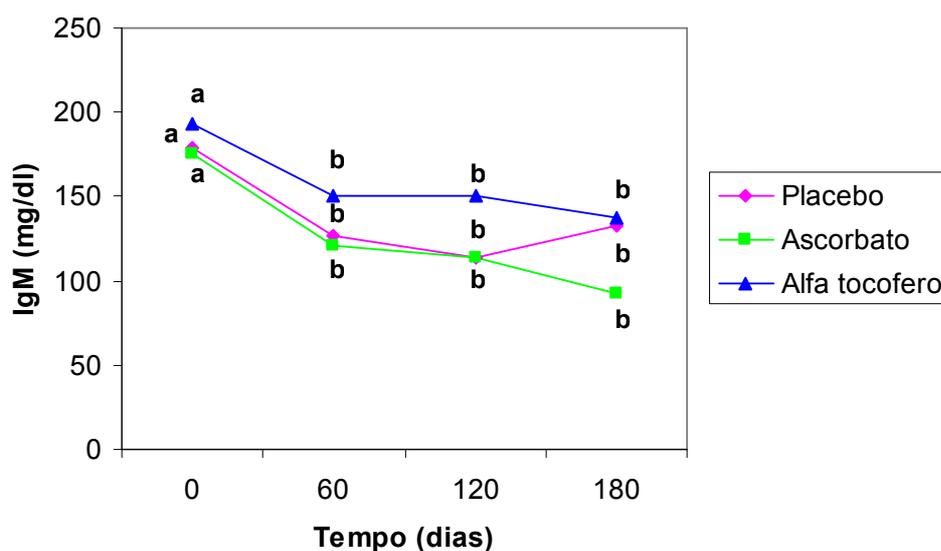


Figura 16. Níveis séricos de IgM (mg/dl) nos tempos 0, 60, 120 e 180 dias após o início do tratamento, nos grupos controle e suplementados.

Efeito do fator tempo:  $p=0,0001$

Interação entre os fatores tempo e tratamentos:  $p=0,511$

Letras diferentes indicam diferenças significativas,  $p < 0.05$

Não foram observados efeitos adicionais da suplementação antioxidante sobre os níveis séricos de IgG ( $p=0,567$ ) e IgM ( $p=0,391$ ) para os três grupos estudados.

### 5.10 Níveis séricos de $\beta 2$ -Microglobulina

Os níveis séricos de  $\beta 2$ -microglobulina, aos 60 dias de tratamento, apresentaram diminuição significativa nos três grupos estudados ( $p=0,0001$ ), seguido de estabilização até o final do período avaliado (Figura 17).

Não foram observados efeitos adicionais da suplementação antioxidante, com ascorbato e  $\alpha$ -tocoferol, sobre a diminuição dos níveis séricos de  $\beta 2$ -microglobulina, durante o período avaliado ( $p=0,120$ ).

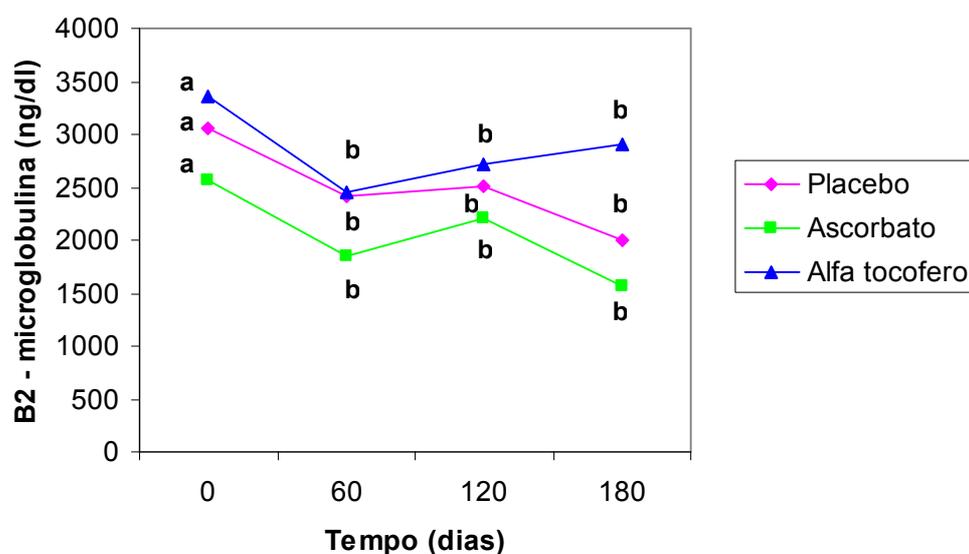


Figura 17. Níveis séricos de  $\beta 2$ -Microglobulina (ng/dl) nos tempos 0, 60, 120 e 180 dias após o início do tratamento, nos grupos controle e suplementados.

Efeito do fator tempo:  $p=0,0001$

Interação entre os fatores tempo e tratamentos:  $p=0,120$

Letras diferentes indicam diferenças significativas,  $p < 0.05$

## 6 DISCUSSÃO

As deficiências nutricionais, comuns na infecção pelo HIV, tornam os pacientes HIV soropositivos mais susceptíveis às infecções oportunistas e aceleram a progressão para Aids, além de reduzirem o sucesso da terapia antirretroviral (Lyn, 2001).

Sabe-se que as funções do sistema imune estão diretamente ligadas ao estado nutricional do paciente, e nesse contexto, o uso de suplementação vitamínica torna-se importante desde os estágios iniciais da infecção pelo HIV (Bodgen, 2000).

Fawzi e colaboradores (2004), verificaram que a suplementação antioxidante incluindo as vitaminas C e E foi capaz de reduzir a incidência de afecções como úlceras orais, esofagite por cândida e outras condições inflamatórias relacionadas à infecção pelo HIV.

As disfunções do trato digestivo, como diarreia, candidíase oral e esofagiana, são comuns no paciente imunocomprometido e podem ser responsáveis pela má absorção e deficiência de micronutrientes como  $\alpha$ -tocoferol e ascorbato (Greenspan, 1994). Além dessas causas, o consumo acelerado das reservas antioxidantes pela excessiva produção de radicais livres por macrófagos e leucócitos polimorfonucleares no curso da infecção pelo HIV, está bem caracterizado e aceito (Allard, 1998a).

Considerando que o aumento das condições pró-oxidantes está associado ao aumento dos níveis de replicação viral, através da ativação de fatores de transcrição como NF- $\kappa$ B e AP-1, o uso de terapia antioxidante vem recebendo atenção de vários grupos de pesquisa (Look, 1998; Allard, 1998; Sprietsma, 1999; Gil, 2003).

Em nosso estudo, verificamos a efetiva inibição da replicação viral, através da diminuição dos níveis plasmáticos de RNA do HIV, nos três grupos estudados, em consequência da administração da TARV, o que já está bem caracterizado (Gulick, 1997;

Hammer, 1997), sem evidenciarmos efeito adicional da suplementação com  $\alpha$ -tocoferol ou ascorbato (Tabela 2). De acordo com a literatura, a instituição da terapia antirretroviral efetiva promove a rápida diminuição da carga viral, no plasma e nos tecidos, e está associada ao aumento da contagem de linfócitos CD4 no sangue periférico (Palella, 1998; Deeks, 1999; Moore, 1999).

Estes resultados são concordantes com os resultados obtidos por Allard e colaboradores (1998), que avaliaram o efeito da suplementação com 800 mg/dia de  $\alpha$ -tocoferol e 1000 mg/dia de vitamina C sobre a inibição da replicação viral e demonstraram uma tendência na redução da carga viral, após três meses de tratamento, sem, contudo, demonstrarem diferenças significativas entre os grupos controle e suplementado.

Neste estudo, a ausência de efeito adicional da suplementação com ascorbato e  $\alpha$ -tocoferol, pode estar refletindo a incapacidade de se atingirem concentrações séricas tão elevadas como as necessárias para que ocorra inibição da replicação viral, como demonstrado em estudos realizados *in vitro* (Harakeh, 1991). Ademais, o aumento expressivo nos níveis plasmáticos de RNA do HIV, observado em um paciente pertencente ao grupo controle, quatro pacientes pertencentes ao grupo suplementado com ascorbato e um paciente do grupo suplementado com  $\alpha$ -tocoferol, aos 180 dias de tratamento, reflete na tendência geral do grupo (Quadro 1, apêndices). Torna-se importante salientar que dos 4 pacientes com níveis elevados de RNA do HIV, pertencentes ao grupo suplementado com ascorbato, 3 permaneceram com os níveis elevados durante todo o período do tratamento, o que pode, neste caso, ser decorrente de falha terapêutica devido ao desenvolvimento de resistência aos antirretrovirais ou à falta de adesão ao tratamento (Deeks, 1999; Raffanti, 2004).

O principal objetivo dos fármacos antirretrovirais é a reconstituição do sistema imune, através da efetiva inibição da replicação viral e do restabelecimento numérico e funcional dos linfócitos CD4 (Gallant, 2002).

No presente estudo, observamos aumento significativo no número de linfócitos CD4 após 60 dias de tratamento, seguido de estabilização até o final do período avaliado, para os três grupos, demonstrando o efeito da terapia antirretroviral, sem, contudo, verificarmos evidências de efeito adicional da terapia suplementar com ascorbato e  $\alpha$ -tocoferol nas concentrações utilizadas (Figura 8).

Estes resultados ratificam os resultados obtidos por Smith e colaboradores (2003) que observaram aumento abrupto da contagem de linfócitos T CD4 após o início da terapia antirretroviral altamente ativa (HAART), seguido por um período de estabilização do número dessas células. Este período de estabilização, observado a partir dos 60 dias de tratamento, deve-se ao fato de que o aumento da produção celular pelos órgãos linfóides somente é observado após meses de terapia antirretroviral e pode ser demonstrado pelo aumento dos níveis de TRECS (*T-cell receptor excision circles*), formados a partir do rearranjo dos receptores de células T, no timo (Al-Harthi, 2000; Spits, 2002). De acordo com Ensolli e colaboradores (2000), a capacidade de regeneração do sistema imune e conseqüente produção *de novo* das células T CD4 pode variar de acordo com o estágio da doença, sendo mais lenta em estágios mais avançados. A administração da terapia antirretroviral efetiva leva à supressão da replicação viral e ao concomitante aumento da contagem de células T CD4, resultante da diminuição dos níveis de apoptose e redistribuição das células a partir dos órgãos linfóides (Autran, 1997; Mezzaroma, 1999; Gougeon, 2003). Em concordância com a teoria da redistribuição celular, Autran e colaboradores (1999) verificaram aumento da contagem de células T CD4 em pacientes

submetidos à terapia antirretroviral após o período de um mês, sem verificarem aumento da expressão de marcadores de proliferação celular.

Nossos resultados corroboram os obtidos por Jaruga e colaboradores (2002), quando não verificaram efeito adicional nos níveis de contagem de linfócitos T CD4 em pacientes submetidos à terapia antirretroviral e suplementados com vitamina A, C e E, após 6 meses de estudo. Contudo, diferem dos resultados obtidos por Fawzi e colaboradores (2004), que, em um estudo duplo-cego e controlado por placebo, avaliando pacientes submetidos à suplementação com multivitaminas (B, C e E), verificaram aumento da contagem de células CD4 e CD8, bem como diminuição dos níveis de RNA do HIV.

O número de linfócitos CD8 não apresentou alteração significativa durante o período de estudo, nos três grupos avaliados (Figura 9), sendo que a relação CD4/CD8 apresentou o mesmo comportamento observado para as células T CD4 (Figura 10). O aumento da relação CD4/CD8, aos 60 dias de tratamento, se deve ao aumento da contagem das células T CD4, decorrente do efeito da terapia antirretroviral.

O aumento dos níveis de apoptose e conseqüente diminuição da viabilidade celular, em pacientes infectados pelo HIV, é a maior causa da depleção dos linfócitos T CD4 nesses pacientes (Gougeon, 2003). Os mecanismos envolvidos incluem a ação citopática direta do vírus sobre as células infectadas, a ativação imune crônica devido à constante exposição aos antígenos do HIV (Ensoli, 2000), bem como o efeito indireto das proteínas virais (Saikumar, 1999; Gougeon, 2003). Além desses fatores, a produção aumentada de espécies reativas de oxigênio é um fator importante e contribuinte para a diminuição dos níveis de viabilidade celular nos pacientes HIV soropositivos (Kramer, 2000; Bautista, 2001).

Como verificado em estudos anteriores (Johnson, 1998; Chavan, 1999), os resultados deste trabalho demonstraram aumento significativo das células viáveis (Figura 11) e conseqüente diminuição dos níveis de apoptose (Figura 12), nos três grupos avaliados, após 60 dias de tratamento, acompanhados pelo aumento significativo do número de células CD4 (Figura 8) e aumento da relação CD4/CD8 (Figura 10). Estes resultados iniciais, possivelmente são decorrentes do efeito da terapia antirretroviral, como demonstrado pela diminuição concomitante dos níveis plasmáticos de RNA do HIV (Tabela 2) e conseqüente diminuição da ativação imune. Estes resultados são concordantes com os obtidos por Ensoli e colaboradores (2000), que verificaram diminuição dos níveis de apoptose dos linfócitos  $CD4^+CD45R0^+$  associada à diminuição da expressão de marcadores de ativação como HLA DR e CD38, em pacientes que iniciaram a terapia antirretroviral altamente ativa (HAART).

O efeito adicional da terapia suplementar com ascorbato é verificado aos 120 dias de tratamento, com um aumento significativo dos níveis de viabilidade celular ( $p=0,002$ ), sendo que este aumento não é verificado no grupo controle, no mesmo período de avaliação. O efeito benéfico da suplementação com ascorbato permanece e pode ser observado ao final do estudo, no período de 180 dias após o início do tratamento.

Aos 180 dias de tratamento, observa-se efeito adicional sobre o aumento da viabilidade celular e diminuição dos índices de apoptose, no grupo suplementado com  $\alpha$ -tocoferol, com relação ao grupo controle. Estes resultados corroboram com estudos anteriores, que demonstraram o efeito citoprotetor do  $\alpha$ -tocoferol na infecção pelo HIV (Barroso, 1997) e são concordantes com os obtidos por Li-Weber e colaboradores (2002), que suplementaram linfócitos periféricos de pacientes HIV soropositivos, *in vitro*, e demonstraram diminuição dos níveis de apoptose em presença de 25 $\mu$ M de vitamina E no meio de cultura.

Da mesma forma, Jaruga e colaboradores (2002) demonstraram a diminuição do dano causado pelo estresse oxidativo, em linfócitos de pacientes suplementados com vitamina C e vitamina E, por um período de seis meses, demonstrado pela diminuição dos níveis séricos de 8-OH-Gua. Danos de extensão limitada aos cromossomos podem ser reparados pelas enzimas celulares, contudo, extensos danos ao DNA como ocasionados pelo estresse oxidativo, podem desencadear apoptose. O mecanismo de ação envolvido na diminuição da 8-OH-Gua foi sugerido por Cooke e colaboradores (1998), onde a vitamina C promove a remoção da 8-OH-Gua e o reparo do DNA através da regulação positiva das enzimas de reparo celular, demonstrado pela diminuição dos níveis de 8-OH-Gua no plasma ou na urina.

Os resultados positivos mais precoces, obtidos através da suplementação com ascorbato em relação à suplementação com  $\alpha$ -tocoferol, podem estar refletindo o efeito do  $\alpha$ -tocoferol sobre o metabolismo dos fármacos antirretrovirais utilizados em conjunto. De acordo com Traber (1995), estudos *in vitro* demonstraram o efeito indutor da vitamina E sobre o sistema citocromo P450, através do receptor PXR (Pregnane X Receptor). Este receptor liga-se ao receptor RXR (Retinoid X Receptor), e como um heterodímero regula a expressão de genes como CYP3A4, envolvidos no metabolismo de xenobióticos (Landes, 2003). Agindo como um ligante para o receptor PXR a vitamina E pode aumentar o metabolismo dos fármacos antirretrovirais, diminuindo suas concentrações plasmáticas e conseqüentemente sua eficácia terapêutica.

Os resultados mais precoces de viabilidade celular verificados no grupo suplementado com ascorbato, podem ter relação com o caráter hidrossolúvel da vitamina C, o que a torna capaz de agir como um antioxidante direto, atuando como scavenger para os radicais livres gerados a partir do processo inflamatório (May, 1999).

Apesar da efetiva inibição da replicação viral, o grupo controle apresenta uma tendência a manter os índices de apoptose após a diminuição inicial, aos 60 dias de tratamento, em decorrência da terapia antirretroviral (Figura 12), em contraste com os grupos suplementados com ascorbato e  $\alpha$ -tocoferol, que gradualmente diminuem os níveis de apoptose aos 120 e 180 dias após o início dos tratamentos (Figura 12).

A disfunção das células B, com produção aumentada de imunoglobulinas e comprometimento na formação de anticorpos antígeno específicos é um conceito bem estabelecido na literatura (Lane; 1983; Shirai, 1992; Lefevre, 1999; Fournier, 2002).

Segundo De Milito e colaboradores (2004) a ativação policlonal dos linfócitos B, responsável pela hipergamaglobulinemia no paciente HIV soropositivo, diminui drasticamente com a instituição da terapia antirretroviral. Conforme relatado por outros autores (Messele, 2001; Moir, 2001; Nagase, 2001; Fournier, 2002; Zamarchi, 2002), observamos níveis basais elevados das imunoglobulinas IgA, IgG e IgM, seguido de diminuição significativa em decorrência do uso de terapia antirretroviral ( $p=0,0001$ ). Estes resultados são concordantes com os obtidos por Notermans e colaboradores (2001) e Jacobson e colaboradores (2002), que observaram diminuição dos níveis séricos de IgG, nos pacientes submetidos à terapia antirretroviral. Os níveis séricos de IgG podem ser utilizados como valor prognóstico, uma vez que pacientes sintomáticos apresentam níveis elevados, quando comparados com indivíduos assintomáticos (De Milito, 2001). A diminuição da hipergamaglobulinemia, relacionada à diminuição dos níveis plasmáticos de RNA do HIV em consequência da instituição da terapia antirretroviral, demonstra que a disfunção das células B está relacionada à carga viral e à progressão da doença (Conge, 1998).

De Milito e colaboradores (2001) demonstraram que os linfócitos B de pacientes HIV soropositivos não tratados apresentam altos níveis de apoptose *in vitro*, o que

resultaria em disfunção do sistema imune humoral. Outros autores verificaram defeitos da resposta imune humoral em pacientes HIV soropositivos (Ballet, 1987; Teeuwssen, 1990; Opravil, 1991), sendo estes defeitos decorrentes da depleção dos linfócitos T CD4 ou da diminuição dos linfócitos B de memória. A diminuição dos linfócitos B de memória está associada à ausência de anticorpos específicos contra os antígenos circulantes, enquanto uma população de células B *naïve* ativadas é responsável pela hipergamaglobulinemia, nos pacientes HIV soropositivos (De Milito, 2004).

Estudos *in vitro* sugerem que as alterações funcionais dos linfócitos B são decorrentes de efeitos diretos devido à infecção dessas células pelo HIV (Gras, 1993). Poulin e colaboradores (1994) demonstraram que os linfócitos B ativados via CD40 podem ser infectados e produzir baixas taxas de partículas virais. Posteriormente, outros autores demonstraram que a infecção das células B ativadas via CD40 ocorre devido ao aumento da expressão do receptor CD4 e do receptor de quimiocinas CXCR4, sugerindo que as células B podem representar um reservatório adicional para o HIV (Moir, 1999).

O valor prognóstico da IgA na infecção pelo HIV tem sido discutido por vários pesquisadores, demonstrando que níveis séricos elevados dessa imunoglobulina, independente ou associada à baixa contagem de linfócitos CD4, indicam progressão mais rápida para AIDS (Philips, 1993; Sabin, 1998).

O grupo suplementado com  $\alpha$ -tocoferol apresentou diminuição mais pronunciada dos níveis de IgA, embora essa diferença não seja estatisticamente significativa ( $p=0,645$ ) (Figura 14), demonstra a tendência de uma melhor resposta do  $\alpha$ -tocoferol na diminuição dos níveis séricos desse marcador. Um estudo mais prolongado avaliando o efeito do  $\alpha$ -tocoferol, poderia trazer resultados mais significativos.

A terapia suplementar com ascorbato e  $\alpha$ -tocoferol não apresentou efeito adicional à terapia antirretroviral na diminuição da hipergamaglobulinemia ( $p=0,511$ ), no entanto,

percebe-se uma tendência de melhores resultados para IgM no grupo suplementado com ascorbato (Figura 16). Da mesma forma como sugerido anteriormente para o marcador IgA, a avaliação desses pacientes por um período mais prolongado, poderia apresentar resultados mais significantes.

Assim como os níveis séricos de IgA, IgG e IgM, os níveis basais elevados de  $\beta$ 2-microglobulina são decorrentes da ativação policlonal dos linfócitos B (Lefevre, 1999; De Milito, 2004), macrófagos (Fauci, 1996) e disfunção dos linfócitos T, devido à infecção pelo HIV e aumento da expressão de citocinas (Cleirici, 1994) e diminuem com a diminuição da ativação imune, após a introdução da terapia antirretroviral (Morris, 1998).

Quando analisados em conjunto, os resultados obtidos nesse trabalho sugerem que o uso da terapia antirretroviral, em associação com a suplementação antioxidante, foi capaz de diminuir a ativação imune que ocorre em consequência da infecção pelo HIV, diminuindo efetivamente os níveis plasmáticos de RNA do vírus, bem como aumentando os níveis de linfócitos CD4 e melhorando significativamente os níveis de viabilidade celular. Tendo em vista os melhores resultados de viabilidade celular obtidos nos grupos suplementados com ascorbato e  $\alpha$ -tocoferol ( $p=0,0001$ ), com relação ao grupo controle, é possível que os níveis plasmáticos de citocinas, como TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-6 e IL-10, características da resposta Th2, estivessem mais baixos nesses pacientes.

Neste sentido, mais estudos realizados por períodos mais prolongados, se fazem necessários para avaliar o efeito da suplementação antioxidante sobre o perfil de citocinas e diminuição dos níveis de apoptose na infecção pelo HIV.

## 7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos pelo presente estudo permitiram concluir que:

- A suplementação com 800 mg/dia de  $\alpha$ -tocoferol foi eficiente em diminuir os níveis de apoptose e conseqüentemente aumentar os níveis de viabilidade celular de linfócitos, em relação ao grupo controle, evidenciando o efeito adicional sobre a terapia antirretroviral;
- A suplementação com 2.000 mg/dia de ascorbato foi eficiente em aumentar os níveis de viabilidade de linfócitos, apresentando efeito adicional e independente da terapia antirretroviral;
- A suplementação com 2.000 mg/dia de ascorbato apresentou uma resposta mais rápida e linear sobre o aumento dos níveis de viabilidade celular, quando comparada com a suplementação com 800 mg/dia de  $\alpha$ -tocoferol ;
- A suplementação com 800 mg/dia de  $\alpha$ -tocoferol e 2.000 mg/dia de ascorbato não apresentou efeito adicional na inibição dos níveis plasmáticos de RNA do HIV-1;
- A suplementação com 800 mg/dia de  $\alpha$ -tocoferol e 2.000 mg/dia de ascorbato não apresentou efeito adicional sobre o aumento da contagem de linfócitos CD4 e aumento da relação CD4/CD8.
- O período de 180 dias não foi suficiente para que pudéssemos verificar variações significativas nos grupos suplementados com 800 mg/dia de  $\alpha$ -tocoferol e 2.000 mg/dia de ascorbato, sobre os marcadores IgA, IgG, IgM e  $\beta$ 2-microglobulina.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGEMATSU, K., HOKIBARA, S., NAGUMO, H., KOMIYAMA, A. **CD27: a memory B-Cell marker.** *Immunology Today* (21): 204-206, 2000.

AGEMATSU, K., NAGUMO, H., OGUCHI, Y., NAKASAWA, T., FUKUSHIMA, K., YASUI, K., ITO, S., KABATA, T., MORIMOTO, C., KOMIYAMA, A. **Generation of plasma cells from peripheral blood memory B cells: Synergistic effect of interleukin-10 and CD27 – CD70 interaction.** *Blood* (91): 173-180, 1998.

ALFANO, M., POLI, G. **Role of cytokines and chemokines in the regulation of innate immunity and HIV infection.** *Molecular Immunology* (42): 161-162, 2005.

AL-HARTHI, L., MARCHETTI, G., STEFFENS, C.M., POULIN, J., SEKALY, R., LANDAY, A. **Detection of T cell receptor circles (TRECS) as biomarkers for de novo T cell synthesis using a quantitative polymerase chain reaction-enzyme linked immunosorbent assay (PCR-ELISA).** *Journal of Immunology Methods* (327): 187-197, 2000.

ALLARD, J.P., AGHDASSI, E., CHAU, J., SALIT, I., WALMSEY, S.L. **Oxidative stress and plasma antioxidant micronutrients in humans with HIV infection.** *American Journal of Clinical Nutrition* (67): 143-147, 1998a.

ALLARD, J.P., AGHDASSI, E., CHAU, J., TAM, C., KOVACS, C.M., SALIT, I.E., WALMSEY, S.L. **Effects of vitamin C and E supplementation on oxidative stress and viral load in HIV-infected subjects.** *AIDS* (12): 1653-1659, 1998.

AMEISEN, J.C., CAPRON, A. **Cell dysfunction and depletion in AIDS: the programmed cell death hypothesis.** *Immunology Today* (12): 102-105, 1991.

AMMARANOND, P., CUNNINGHAM, P., OELRICHS, R., SUZUKI, K., HARRIS, C., LEAS, L., GRULICH, A., COOPER, D.A., KELLEHR, A.D. **Rates of transmission of antiretroviral drug resistant strains of HIV-1.** *Journal of Clinical Virology* (26): 153-161, 2003.

ARNOULT, D., FRÉDÉRIC, P., LELIÈVRE, J.D., ESTAQUIER, J. **Mitochondria in HIV induced Apoptosis.** *Biochemical and Biophysics Research Communications* (304): 561-574, 2003.

ARPIN, C., DECHANET, J., VAN KOOTEN, C., MERVILLE, P., GROUARD, G., BRIERE, F., BANCHEREAU, J., LIU, Y.J. **Generation of memory B cells and plasma cells *in vitro*.** *Science* (268): 720-722, 1995.

ARRIGO, A.P. **Gene expression and the thiol redox state.** *Free Radical Biology & Medicine* (27): 936-944, 1999.

ARTHUR, L.O., BESS, J.W., SOWDER, Jr., BENVENISTE, R.C.I., MANN, D.L., CHERMAN, J-C, HENDERSON, L.E. **Cellular proteins bound to immunodeficiency virus: implications for pathogenesis and vaccines.** *Science* (258): 1935-1938, 1992.

ASHTON, L.J., CARR, A., CUNNINGHAM, P.H., ROGGENSACK, M., MCLEAN, K., LAW, M., ROBERTSON, M., COOPER, D.A., KALDOR, J.M. **Predictors of progression in long-term nonprogressors.** *Australian Long-Term Nonprogressor Study Group.* *AIDS* (14):117-121, 1998.

- AUTRAN, B., CARCELAIN, G., LI, T.S., BLANC, C., MATHEZ, D., TUBIANA, R., KATLANA, C., DEBRE, P., LEIBOVITCH, J. **Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease.** *Science* (277): 112-116, 1997.
- AUTRAN, B., CARCELAIN, G., LI, T.S., GOROCHOV, G., BLANC, C., RENAUD, M., DURALI, M., MATHEZ, D., CALVEZ, V., LEIBOVITCH, J., KATLANA, C., DEBRÉ, P. **Restoration of the immune system with anti-retroviral therapy.** *Immunology Letters* (66): 207-211, 1999.
- AZZI, A., STOCKER, A. **Vitamin E: non-antioxidant roles.** *Progress in Lipid Research* (39): 231-255, 2000.
- BADLEY, A. D., PILON, A. A., LANDAY, A., LYNCH, D. H. **Mechanisms of HIV-associated lymphocyte apoptosis.** *Blood* (96): 2951 –2964, 2000.
- BADLEY, A.D., ROUMIER, T., LUM, J.J., KROEMER, G. **Mitochondrion-mediated apoptosis in HIV-1 infection.** *Trends in Pharmacological Sciences* (24): 298 – 305, 2003.
- BADOU, A., BENNASER, Y., MOREAU, M., LECLERC, C., BENKIRANE, M., BAHRAOUI, E. **Tat protein of human immunodeficiency virus type 1 induces interleukin 10 in human peripheral blood monocytes: implication of protein kinase C dependent pathway.** *Journal of Virology* (74): 10551-10562, 2000.
- BALLET, J.J., SULCEBE, G., COUDERC, L.J., DANON, F., RABIAN, C., LATHOP, M., CLAUVEL, J.P., SELIGMANN, M. **Impaired anti-pneumococcal antibody response in patients with AIDS-related persistent generalized lymphadenopathy.** *Clinical Experimental Immunology* (68): 479-487, 1987.
- BANCHEREREAU, J., PACZESNY, S., BLANCO, P., BENNETT, L., PASCUAL, V., FAY, J., PALUCKA, A.K. **Dendritic cells: controllers of the immune system and a new promise for immunotherapy.** *Annals of the New York Academy of Sciences* (987): 180-187, 2003.
- BÁNHEGYI, G., BRAUN, L., CSALA, M., PUSKÁS, F., MANDL, F. **Ascorbate metabolism and its regulation in animals.** *Free Radical & Biology Medicine* (23): 793-803, 1997.
- BARCOVA, M.; KACANI, L.; SPETH, C.; DIETRICH, M. P. **gp41 envelope protein of human immunodeficiency virus induces interleukin IL-10 in monocytes, but not in B, T or NK cells, leading to reduced IL-2 and interferon- $\gamma$  production.** *Journal of Infectious Diseases* (177): 905 – 913, 1998.
- BARIBAUD, F., POHLMANN, S., DOMS, R.W. **The role of DC-SIGN and DC-SIGNR in HIV and SIV attachment, infection, and transmission.** *Virology* (286): 1-6, 2001.
- BARROSO MP, GÓMEZ-DÍAZ C, LÓPEZ-LLUCH G, MALAGÓN MM, CRANE FL, NAVAS P. **Ascorbate and alpha-tocopherol prevent apoptosis induced by serum removal independent of bcl-2.** *Archives of Biochemistry and Biophysics* (343): 243-248, 1997.
- BARRÉ-SINOUSSE, F., CHERMANN, J.C., REY, F., NUGEYRE, M.T., CHAMARET, S., GRUEST, J., DAUGUET, C., AXLER-BLIN, C., VEZINET-BRUN, F., ROUZIOUX, C., ROZENBAUM, W., MONTAGNIER, L. **Isolation of a T-lymphotropic retroviruses from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS).** *Science* (220): 868-871, 1993.

- BAUTISTA, A.P. **Free radicals, chemokines and cell injury in HIV-1 and SIV infections and alcoholic hepatitis.** Free Radical Biology and Medicine (31):1257-1352, 2001.
- BIRGINO, E., HARAGUCHI, S., KOUTSONIKOLIS, A., CIANCIOLO, G.J., OWENS, V., GOOD, R.A., DAY, N.K. **Interleukin 10 is induced by recombinant HIV-1 Nef protein involving the calcium/calmodulin-dependent phosphodiesterase signal transduction pathway.** PNAS (94): 3178-1982, 1997.
- BLAY, J. Y., BURDIN, N., ROUSSET, F., LENOIR, G., BIRON, P., PHILIP, T., BANCHEREAU, J., FAVROT, M.C. **Serum interleukin-10 in non Hodgkin's lymphoma: a prognostic factor.** Blood (82): 2169-2174, 1993.
- BODGEN, J.D., KEMP, F.W., HAN, S., LI, W., BRUENING, K., DENNY, T., OLESKE, J. M., BAKER, L.H., PEREZ, G., KLOSER, P., SKURNICK, J., LOURIA, D.B. **Status of selected nutrients and progression of human immunodeficiency virus type 1 infection.** American Journal of clinical Nutrition (72): 809-815, 2000.
- BOSSIS, G., SALINAS, S., CARTIER, C., DEVAUX, C., BRIANT, L. **NF- $\kappa$ B activation upon interaction of HIV-1 envelope glycoproteins with cell surface CD4 involves I $\kappa$ B kinases.** FEBS Letters (516): 257-264, 2002.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Coordenação Nacional de DST/AIDS. **Boletim Epidemiológico – AIDS**, ISSN: 1517-1159. Ano XVII, Nº 01, 01 a 52 Semana Epidemiológica, janeiro a dezembro, 2003.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Coordenação Nacional de DST/AIDS. **Boletim Epidemiológico – AIDS**, ISSN: 1517-1159. Ano XVIII, Nº 01, 1ª a 26ª Semana Epidemiológica, janeiro a junho, 2004.
- BREEN, E. C. **Pro and anti-inflammatory cytokines in human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome.** Pharmacology & Therapeutics (95): 295-304, 2002.
- BREEN, E.C., REZAI, A.R., NAKAJIMA, K., HIRANO, T., BEALL, G.N., MITSUYASU, R.T., KISHIMOTO, T., MARTINEZ-MAZA, O. **Elevated levels of interleukin-6 are associated with human immunodeficiency virus (HIV) infection.** Journal of Immunology (144): 480-484, 1990.
- BREITKREUTZ, R., PITTACK, N., NEBE, C.T., SCHUSTER, D., BRUST, J., BEICHERT, M., HACK, V., DANIEL, V., EDLER, L., DROGE, W. **Improvement of immune functions in HIV infection by sulfur supplementation: two randomized trials.** Journal of Molecular Medicine (78): 55-62, 2000.
- BRENNAN, P., O'NEILL, L.A. **Effects of oxidants and antioxidants on nuclear factor Kappa B activation in three different cell lines: evidence against a universal hypothesis involving oxygen radicals.** Biochimica et Biophysica Acta (2): 167-175, 1995.
- BRIGATI, C., GIACCA, M., NOONAN, D., ALBINI, A. **HIV Tat, its TARgets and the control of viral gene expression.** FEMS Microbiology Letters (220): 57-65, 2003.
- BUDIHardJO, I., OLIVER, H., LUTTER, M., LUO, X. e WANG, X. **Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis.** Annual Review of Cell and Developmental Biology (15): 269-290, 1999.
- BULGER, E. M., MAIER, R. **Antioxidantes no Paciente Crítico. Investigação Original.** Archives of Surgery. American Medical Association (136) (*Supl.*), 2001.

CONGE, A.M., TARTE, K., REYNES, J., SECONDY, M., GERFAUX, J., ZEMBALA, M., VENDRELL, J.P. **Impairment of B-lymphocyte differentiation induced by dual triggering of the B-cell antigen receptor and CD40 in advanced HIV-1 disease.** AIDS (12): 1437-1449, 1998.

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

CAMERINI, D., WALZ, G., LEONEN, W.A., BORST, J., SEED, B. **The T cell activation antigen CD27 is a member of the nerve growth factor/ tumor necrosis factor receptor gene family.** Journal of Immunology (147): 3165-3169, 1991.

CAMERON, D. W. **Ritovavir and saquinavir combination therapy for the treatment of HIV infection.** AIDS (13): 213- 224, 1998.

CAMPBELL, J.D., COLE, M., BUNDITRUTAVORN, B., VELLA, A. T. **Ascorbic acid is a potent inhibitor of various forms of T cell apoptosis.** Cellular Immunology (194): 1-5, 1999.

CARR, A., FREI, B. **Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions?** FASEB Journal (13): 1007-1024, 1999.

CASTEDO, M., FERRI, K., BLANCO, J., ROUMIER, L. N., BARRETINA, J., AMENDOLA, A., NARDACCI, R., MÈTIVIER, D., ESTE, J., PIACENTINI, M., KROEMER, G. **Human Immunodeficiency Virus-1 Envelope Glycoprotein Complex-Induced apoptosis Involves Mammalian Target of Rapamycin/FKBP12-Rapamycin-associated Protein-mediated p-53 Phosphorylation.** J. Exp. Med. The Rockefeller University Press (194): 1097-1110, 2001.

CASTEDO, M., FERRI, K., ROUMIER, T., MÈTIVIER, D., ZAMZAMI, N., KROEMER, G. **Quantitation of mitochondrial alterations associated with apoptosis.** Journal of Immunological Methods (265): 39-47, 2002a.

CASTEDO, M., KROEMER, G. **The beauty of death.** Trends in Cell Biology (12): 446-447, 2002b.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Guidelines for national human immunodeficiency virus case surveillance, including monitoring for human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome.** MMWR (48): 1-31, 1999.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **HIV/AIDS Surveillance Report – Reported to CDC-Dec-2001: [www.cdc.gov/publications.htm](http://www.cdc.gov/publications.htm).**, 2002.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Revised Classification System for HIV Infection and Expanded Surveillance case Definition for AIDS among Adolescents and Adults.** MMWR, Atlanta, 1993.

CHAI, J., DU, C., WU, J.W., KYRIN, S., WANG, X., SHI, Y. **Structural and Biochemical basis of apoptotic activation by smac/DIABLO.** Nature (406): 855-862, 2000.

CHAIX, C., SENNELIER, C., CLEVENBERGH, P., DURANT, J., SCHAPIRO, J.M., DELLAMONICA, P., ZALESKI, I. **Economic Evaluation of Drug Resistance Genotyping for the Adaptation of Treatment in HIV-Infected Patients in the**

- VIRADAPT Study.** Journal of Acquired Immunodeficiency Syndrome (24): 227 – 231, 2000.
- CHAPHAM, P.R., WEISS, R.A. **Spoilt choice of co-receptors.** Nature (388): 230-231, 1997.
- CHAVAN SJ, TAMMA SL, KAPLAN M, GERSTEN M, PAHWA SG. **Reduction in T Cell Apoptosis in patients with HIV disease Following Anti-retroviral Therapy.** Clinical Immunology (93): 24-33, 1999.
- CHIRMULE, N., PAHWA, S. **Envelope glycoproteins of human immunodeficiency virus type 1: profound influences on immune function.** Microbiology (60): 386-406, 1996.
- CLEIRICI, M., WYNN, T.A., BERZOFSKY, A.P., BLATT, C.W., HENDRIX, A., SHER, A., COFFMAN, R.L., SHEAVER, G.M. **Role of interleukin-10 in T helper cell dysfunction in asymptomatic individuals infected with human immunodeficiency virus.** Journal of Clinical Investigations (93): 768-775, 1994.
- COFFIN, J., HAASE, A., LEVY, J.A., MONTAGNIER, L., OROSZLAN, S., TEICH, N., TEMIN, H., TOYOSHIMA, K., VARMUS, H., VOGT, P. **What to call the AIDS virus?** Nature (321): 10, 1986.
- COHEN, O.J., KINTER, A., FAUCI, A.S. **Host Factors in the Pathogenesis of HIV Disease.** Reviews Immunology (159): 31-48, 1997.
- CONTRERAS, X., BENNASSER, Y., BAHRAOUI, E. **IL-10 production induced by HIV Tat stimulation of human monocytes is dependent on the activation of PKC  $\beta_{II}$  and  $\delta$  isoenzymes.** Microbes and Infection (6): 1182-1190, 2004.
- COOKE, M.S., EVANS, M.D., PODMORE, I.D., HERBERT, K.E., MISTRY, N., MISTRY, P., HICKENBOTHAM, P.T., HUSSIENI, A., GRIFFITHS, H.R., LUNEC, J. **Novel Repair action of vitamin C upon in vivo oxidative DNA damage.** FEEBS Letters (439): 363-367, 1998.
- COOPER, G.M. **A Célula: uma abordagem molecular.** 2º Ed. Porto Alegre: Artmed, 2001.
- COTTON, M. F., IKLE, D. N., RAPAPORT, E. L., MARSCHNER, S., TSENG, P.O., KURRLE, R., FINKEL, T.H. **Apoptosis of CD4 + and CD8+ T cells isolated mediately ex vivo correlates with disease severity in human immunodeficiency virus type 1 infection.** Pediatric Research (42): 656-664, 1997.
- CROSS, C. E., VAN DER VLIET, A., O'NEILL, C. A., LOUIE, S., HALLIWELL, B., **Oxidants, antioxidants and respiratory tract lining fluids.** Environmental Health Perspective (102): 185-191, 1994.
- DARMON, A. J., NICHOLSON, D.W., BLEAKLEY, R.C. **Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B.** Nature (377): 446-448, 1995.
- DE MILITO, A., MORCH, C., SÖNNERBORG, A., CHIODI, F. **Loss of (CD27) B lymphocytes in HIV-1 infection.** AIDS (15): 957-964, 2001.
- DE MILITO, A. **B lymphocyte dysfunctions in HIV infection.** Current HIV Research (2): 11-21, 2004a.
- DE MILITO, A., NILSSON, A., TITANJI, K., THORSTENSSON, R., REIZENSTEIN, E., NARITA, M., GRUTZMEIER, S. **Mechanisms of hypergammaglobulinemia and**

**impaired antigen-specific humoral immunity in HIV-1 infection.** *Blood* (103): 2180-2186, 2004b.

DE OLIVEIRA PINTO, L., GARCIA, S., LECOEUR, H., RAPP, C., GOUGEON, M.L. **Increased sensitivity of T lymphocytes tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1) and TNFR2 mediated apoptosis in HIV infection: relation to expression of Bcl-2 and active caspase-8 and caspase-3.** *Blood* (99): 1666-1675, 2002.

DEEKS, S.G., HECHT, F.M., SWANSON, M., ELBEIK, T., LOFTUS, R., COHEN, P., GRANT, R.M. **HIV RNA and CD4 cell count responses to protease inhibitor therapy in an urban AIDS clinic: response to both initial and salvage therapy.** *AIDS* (13): 35-43, 1999.

DEVERAUX, Q.L., REED, J.C. **IAP family proteins- suppressors of apoptosis.** *Gene* (13): 239-252, 1999.

DU, C., FANG, M., LI, Y., WANG, X. **Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation during apoptosis.** *Cell* (102): 33-42, 2000.

EDELMAN, L., DEVEAU, C., RAPHAEL, M., MONCHATRE, E., GABARRE, J., DEVILLE-CHABROL, A., PIALOUX, G., EMILIE, D., JOAB, J., GALANAUD, P. **Serum interleukin-10 in acquired immunodeficiency syndrome lymphoma patients.** *European Journal of Cytokine Network* (7): 785-792, 1996.

ELBIM, C., PILLET, S., PREVOST, M.H., PREIRA, A., GIRARD, P.M., ROGINE, N., HAKIM, J., ISRAEL, N., GOUGEROT-PONCIDALO, M.A. **The role of phagocytes in HIV-related oxidative stress.** *Journal of Clinical Virology* (20): 99-109, 2001.

EMILIE, D., ZOU, W., FIOR, R., LORENTE, L., DURANDY, A., CREVON, M.C., MAILLOT, M. C., DURAND-GASSELIN, L., RAPHAEL, M., PEUCHMAUR, M., GALANAUD, P. **Production and roles of IL-6, IL-10 and IL-13 in B-lymphocyte malignancies and in B-lymphocyte hyperactivity of HIV infection and autoimmunity.** *European Journal of Immunology Methods* (11): 133-142, 1997.

ENSOLI, F., FIORELLI, V., ALARIO, C., DE CRISTOFARO, M., MURATORI, D.S., NOVI, A., CUNSOLO, M.G., MAZZETTA, F., GIOVANNETTI, A., MOLLICONE, B., PINTER, E., AIUTI, F. **Decreased T cell apoptosis and T cell recovery during highly active antiretroviral therapy (HAART).** *Clinical Immunology* (97): 9-20, 2000.

EVANS, W. J. **Vitamin E, vitamin C, and exercise.** *American Society for Clinical Nutrition* (72): 647-652, 2000.

FAUCI, A. S. **Multifactorial nature of human immunodeficiency virus disease: implications for therapy.** *Science* (262): 1011-1018, 1993.

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

FAWZI, W. **Micronutrients and human immunodeficiency virus type 1 disease progression among adults and children.** *Clinical Infectious Diseases* (37): 112-116, 2003.

FAWZI, W., MSAMANGA, G.I., SPIEGELMAN, D., WEI, R., KAPIGA, S., VILLAMOR, E., MWAKAGILE, D., MUGUSI, F., HERTZMARK, E., ESSEX, M., HUNTER, D.J. **A randomized trial of multivitamin supplements and HIV disease progression and mortality.** *The New England Journal of Medicine* (351): 23-32, 2004.

FERRI, K.F., JACOTOT, E., BLANCO, J., ESTÉ, J. A., ZAMZAMI, N., SUSIN, S.A., XIE, Z., BROTHERS, G., REED, J.C., PENNINGER, J. M., KROEMER, G. **Apoptosis Control in Syncytia Induced by the HIV Type 1-Envelope Glycoprotein Complex: Role of Mitochondria and Caspases.** Journal of Experimental Medicine (192): 1081-1092, 2000.

FIorentino, D. F., ZLOTNIK, A., MOSMANN, T.R., O'GARRA, A. **IL-10 Inhibits cytokine production by activated macrophages.** Journal of Immunology (147): 3815 – 3822, 1991.

FOURNIER, A.N., FONDERE, J-M., ALIX-PANABIÈRES, C., MERLE, C., BAILLAT, V., HUGUET, M-F., TAÏB, J., OHAYON, V., ZEMBALA, M., REYNES, J., VENDRELL, J.P. **Spontaneous secretion of immunoglobulins and anti-HIV-1 antibodies by *in vivo* activated B lymphocytes from HIV-1 infected subjects: monocyte and natural killer cell requirement for *in vitro* terminal differentiation into plasma cells.** Clinical Immunology (103): 98-109, 2002.

FREI, B. **Molecular and biological mechanisms of antioxidant action.** The FASEB Journal (13): 963-964, 1999.

FRIEDLAND, G.H., KLEIN, R.S. **The transmission of the human immunodeficiency virus.** New England Journal of Medicine (317): 1125-1135, 1987.

FRIEDMAN, P.A., ZELDEL, M.L. **Victory at C.** Nature Medicine (5): 620-621, 1999.

GABRILOVITCH, D.I., SHEPELVA, G.K., SEREBROVSKAYA, L.V., AVDEEVA, L.A., SUVOROVA, Z.K., ROSLY, I.M., OGANEZOV, V.K., SAIDOV, M.Z., PANYUTICH, A.V., POKROVSKY, V.V. **Mononuclear cells from HIV-infected patients produce factors which enhance functional activity of polymorphonuclear neutrophils from healthy subjects.** Clinical and Experimental Immunology (89): 362-369, 1992.

GAIDANO, G., CAPELLO, D., CARBONE, A. **The molecular basis of acquired immunodeficiency syndrome-related lymphomagenesis.** Seminars in Oncology (27): 431-441, 2000.

GALLANT, J.E. **Initial Therapy of HIV Infection.** Journal of Clinical Virology (25): 317-333, 2002.

GALLO, R.C., SALAHUDDIN, S.Z., POPOVIC, M., SHEARER, G.M., KAPLAN, M., HAYNES, B.F., PALKER, T.J., REDFIELD, R., OLESKE, J., SAFAI, B., WHITE, G., FOSTER, P., MARKHAM, P.D. **Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses from patients with AIDS and at risk at AIDS.** Science (224): 500-503, 1984.

GEIJTENBEEK, T.B., TONRESMA, R., VAN VLIET, S.J. **Identification of DC-SIGN a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses.** Cell (100): 491-494.

GIL, L., MARTINEZ, G., GONZÁLEZ, I., TARINAS, A., ÁLVAREZ, A., GIULIANI, A., MOLINA, R., TÁPANES, R., PÉREZ, J., LEÓN, O.S. **Contribution to characterization of oxidative stress in HIV/AIDS patients.** Pharmacological Research (47): 217-224, 2003.

GOUGEON, M.L. **Apoptosis as an HIV strategy to scape immune attack.** Nature Reviews Immunology (3): 392-404, 2003.

GOUGEON, M.L., LECOEUR, H., DULIOUST, A., ENOUF, M. G., CROUVOISIER, M., GOUJARD, D., MONTAGNIER, L. **Programmed cell death in peripheral lymphocytes from HIV- infected persons.** *The Journal of Immunology* (156): 3509-3520, 1996.

GOUGEON, M.L., MONTAGNIER, L. **Programmed Cell Death as a Mechanism of CD4 and CD8 T Cell Deletion in AIDS: Molecular Control and effect of Highly Active Anti-retroviral Therapy.** *Annual Reviews of New York Academy of Sciences* (887): 199-212, 1999.

GRAS, G., RICHARD, Y., ROQUES, P., OLIVIER, R., DORMONT, D. **Complement and virus-specific antibody dependent infection of normal B lymphocytes by human immunodeficiency virus type-1.** *Blood* (81): 1808-1818.

GRAZIOSI, C., PANTALEO, G., BUTINI, L., DEMAREST, J., SAAG, M.S., SHAW, G.M., FAUCI, A.S. **Kinetics of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) DNA and RNA synthesis during primary HIV-1 infection.** *Proceedings of the National Academy of Sciences – USA* (90): 6405-6409, 1993.

GREEN, D. R., REED, J. C. **Mitochondria and apoptosis.** *Science* (281): 1309-1311, 1998.

GREENSPAN, H.C., ARUMOMA, O.I. **Oxidative stress and apoptosis in HIV infection: a role for plant-derived metabolites with synergistic antioxidant activity.** *Immunology Today* (15): 209-213, 1994.

GULICK, R.M., MELLORS, J.W., HAVLIR, D., HERON, J.J., GONZALEZ, C., MCMAHON, D., RICHMAN, D.D., VALENTINE, F.T., JONAS, L., MEIBOHM, A., EMINI, E.A., CHODAKEWITZ, J.A. **Treatment with indinavir, zidovudine and lamivudine in adults with human immunodeficiency virus infection and prior antiretroviral therapy.** *New England Journal of Medicine* (337): 734-739, 1997.

HAMMER, S.M., SQUIRES, K.E., KATHLEEN, E., HUGHES, M.D., MICHAEL, D. **A controlled trial of two nucleoside analogues plus indinavir in persons with human immunodeficiency virus infection and CD4 cell counts of 200 per cubic millimeter or less.** *New England Journal of Medicine* (337): 725-753, 1997.

HARAKEH, E., JARIWALLA, R. **NF- $\kappa$ B independent suppression of HIV expression by ascorbic acid.** *AIDS Research and Human Retroviruses* (13): 235-239, 1997.

HARAKEH, S., JARIWALLA, R.J. **Comparative study of the anti-HIV activities of ascorbate and thiol-containing reducing agents in chronically HIV-infected cells.** *American Journal of Clinical Nutrition* (54): 1231-1235, 1991.

HARAKEH, S., NIEDZWIECKI, A., JARIWALLA, R.J. **Mechanistic aspects of ascorbate inhibition of human immunodeficiency virus.** *Chemical and Biology* (91): 207-215, 1994.

HARDMAN, J.G., LIMBIRD, L.E., MOLINOFF, P.B., RUDDON, R.W., GILMAN, G.A. **As bases farmacológicas da terapêutica.** 10<sup>o</sup> Ed. McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2003.

HAY, B. A. **Understanding IAP function and regulation: a view from Drosophila.** *Cell Death Differentiation* (7): 1045-1056, 2000.

HEIDEN, M. G. V., THOMPSON, C. B. **Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis?** *Nature Cell Biology* (1): 209-216, 1999.

- HENGARTNER M. O. **The biochemistry of apoptosis.** Nature (407): 769-816, 2000.
- HENKEL, T., MACHLEIDT, T., ALKALAY, I., KRONKE, M., BEN-NERIAH, Y., BAUERLE, P.A. **Rapid proteolysis of I $\kappa$ B- $\alpha$  is necessary for activation of transcription factor NF- $\kappa$ B.** Nature (365): 182-185, 1993.
- HO, D.D., NEUMANN, A.U., PERELSON, A.S., CHEN, W., LONARD, J.M., MARKOWITZ, M. **Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection.** Nature (373): 123-126, 1995.
- HUI, D.Y. **Effects of HIV protease inhibitor therapy on lipid metabolism.** Progress in Lipid Research (42): 81-92, 2003.
- HUNZIKER, L., RECHER, M., MACPHERSON, A.J., CIUREA, A., FREIGANG, S., HENGARTNER, H., ZINKERNAGEL, R.M. **Hypergammaglobulinemia and autoantibody induction mechanisms in viral infections.** Nature Immunology (4): 343-349, 2003.
- JACOBSON, M.A., KHAIAM-BASHI, H., MARTIN, J.N., BLACK, D. **Effect of long term highly active antiretroviral therapy in restoring HIV-induced abnormal B-lymphocyte function.** AIDS (31): 472-477, 2002.
- JARIWALLA, R., HARAKEH, S. **Antiviral and immunomodulatory activities of ascorbic acid.** Subcellular Biochemistry (25): 215-231, 1996.
- JARUGA, P. **Oxidation mechanisms and anti-oxidation in HIV infected patients-effect on disease progression.** Postepy Higieny Medycyny Doswiadczalne (53): 43-54, 1999.
- JARUGA, P., JARUGA, B., GACKOWSKI, D., OLCZAK, A., HALOTA, W., PAWLOWSKA, M., OLINSKI, R. **Supplementation with antioxidant vitamins prevents oxidative modification of DNA in lymphocytes of HIV-infected patients.** Free Radical Biology & medicine (32): 414-420, 2002.
- JEENINGA, R.E., HOOGENKAMP, M., ARMAND-UGON, M., DE BAAR, M., VERHOET, K., BERKHOUT, B. **Functional differences between the long terminal repeat transcriptional promoters of human immunodeficiency virus type 1 subtypes A through G.** Journal of Virology (74): 3740-3751, 2000.
- JOHNSON N, PARKIN JM. **Anti-retroviral therapy reverses HIV-associated abnormalities in lymphocyte apoptosis.** Clinical and Experimental Immunology (113): 229-234, 1998.
- KARMOCHKINE, M., PARIZOT, C., CALVEZ, V., COUTELLIER, A., HERSON, S., DEBRÉ, P., GOROCHOV, G. **Susceptibility of Peripheral Blood Mononuclear Cells to Apoptosis is Correlated to Plasma HIV Load.** Journal of Acquired Immunodeficiency Syndrome (17): 419-423, 1998.
- KLAUS, G.B.G., **Lymphocytes: Review.** Nature (1): 1-8, 2001.
- KOBOR, M.S., GREENBLATT, J. **Regulation of transcription elongation by phosphorylation.** Biochimica et Biophysica Acta (1577): 261-275, 2002.
- KORBER, B., THEILER, J., WOLINSKY, S. **Limitations of a molecular clock applied to considerations of the origin of HIV-1.** Science (280): 1868-1871, 1998.
- KOROLKOVAS, A. **Dicionário terapêutico Guanabara.** Guanabara-Koogan, 2000.

- KRAMER, P.H. **CD95's deadly mission in the immune system.** *Nature* (407): 789-795, 2000.
- KUTININK, M.A., SKALA, J.A., SAUBERLICH, H.E., OMAJE, S.T. **Simultaneous determination of ascorbic acid and uric acid in human plasma by high-performance liquid chromatography with amperometric detection.** *Journal of Liquid Chromatography* (8): 31-46, 1985.
- LAHTI, S., MANNINEN, A., SAKSELA, K. **Regulation of T cell activation by HIV-1 accessory proteins: Vpr acts via distinct mechanisms to cooperate with Nef in NFAT directed gene expression and to promote transactivation by CREB.** *Virology* (310): 190-196, 2003.
- LALEZARI, J.P., HENRY, K., O'HEARN, M., MONTANER, J. S. G., PILIERO, P., TROTTER, B., WALMSLEY, S., COHEN, C., KURITZKES, D. R., ERON, J., CHUNG, J., DEMASI, R., DONATACCI, L., DROBNES, C., DELEHANTY, J. **Enfuvirtide, an HIV-1 Fusion Inhibitor, for Drug-Resistant HIV Infection in North and South America.** *The New England Journal of Medicine* (348): 2175-2185, 2003.
- LANDES N, PFLUGER P, KLUTCH D. **Vitamin E activates gene expression via the pregnane X receptor.** *Biochemical Pharmacology* (65): 269-273, 2003.
- LANE, H.C., MASUR, H., EDGAR, L.C., WHALEN, G., ROOK, A.H., FAUCI, A. **Abnormalities of B-cell activation and immunoregulation in patients with acquired immunodeficiency syndrome.** *New England Journal of Medicine* (309): 453-458, 1983.
- LASSUS, P., OPITZ-ARAYA, X., LAZEBNIK, Y. **Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization.** *Science* (297): 1352-1354, 2002.
- LEE, R., BEAUPARLANT, P., ELFORD, H., PONKA, P. and HISCOTT, J. **Selective inhibition of I kappa B alpha phosphorylation and HIV-1 LTR gene expression by novel antioxidant compounds.** *Virology* (234): 277-290, 1997.
- LEFEVRE, E., KRZYSIEK, R., LORET, E., GALANAUD, P., RICHARD, I. **HIV-1 Tat protein differentially modulates the B cell response of naive, memory, and germinal center B cells.** *Journal of Immunology* (163): 1119-1122, 1999.
- LEVY, J.A., KAMINSKY, L.S., MORROW, W.J. **Infection by the retrovirus associated with the acquired immunodeficiency syndrome.** *Annual Internal Medicine* (103): 694-699, 1984.
- LEVY, J.A., KAMINSKY, L.S., MORROW, W.J., STEIMER, K., LUCIW, P., DINA, D., HOXIE, J., OSHIRO, L. **Infection by the retrovirus associated with the acquired immunodeficiency syndrome: Clinical, biological, and molecular features.** *Annales Internal Medicine* (103): 694- 699, 1985.
- LI, P., NIJHAWAN, D., BUDIARDJO, I., SRINIVASULA, S.M., AHMAD, M., ALNEMRI, E.S., WAMG, X. **Cytochrome C and d-ATP dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade.** *Cell* (91): 479-489, 1997.
- LISZIEWICZ, J., LORI, F. **Structured treatment interruptions in HIV/AIDS therapy.** *Microbes and Infection* (4): 207-214, 2002.
- LI-WEBER, M., WEIGARD, M.A., GIASI, M., SUSS, D., TREIBER, M.K., BAUMANN, S., RITSOU, E., BREITKREUTZ, R., KRAMMER, P.H. **Vitamin E inhibits CD95**

**ligand expression and protects T cells from activation-induced cell death.** *Journal of Clinical Investigations* (110): 681-690, 2002.

LOOK, M.P., ROCKSTROH JK, RAO G.S., BARTON S., LEMOCH, H., KAISER, R., KUPFER, B., SUDHOP, T., SPENGLER, U., SAUERBRUCH, T. **Sodium selenite and N-acetylcysteine in antiretroviral-naive HIV-1-infected patients: a randomized, controlled pilot study.** *European Journal of Clinical Investigation* (28): 389-397, 1998.

LUSIC, M., MARCELLO, A., CERESETO, A., GIACCA, M. **Regulation of HIV-1 gene expression by histone acetylation and factor recruitment at the LTR promoter.** *The EMBO Journal* (22): 6550-6561, 2003.

LUTSENKO, E. A., CÁRCAMO, J. M., GOLDE, D., **Vitamin C prevents DNA mutation induced by oxidative stress.** *The Journal of Biological Chemistry* (10): 16895-16899, 2002.

LYN, P. **Nutrients and HIV: Part 2-Vitamins A and E, zinc, B-vitamins, and magnesium.** *Alternative Medicine Review* (5): 39-51, 2000.

MAHLKNECHT, U., DENG, C., LU, M.C., GREENOUGH, T.C., SULLIVAN, J., O'BRIEN, W.A., HERBEIN, G. **Resistance to apoptosis in HIV-infected T lymphocytes is mediated by macrophages: Role for Nef and immune activation in viral persistence.** *The Journal of Immunology* (165): 6437-6446, 2000.

MALASPINA, A., MOIR, S., KOTILIL, S., HALLAHAN, C.W., EHLER, L.A., LIU, S., PLANTA, M.A., CHUN, T-W., FAUCI, A.S. **Deleterious effect of HIV-1 viremia on B cell costimulatory function.** *The Journal of Immunology* (170): 5965-5972, 2003.

MARCELLO, A., LUSIC, M., PEGORATO, G., PELLEGRINI, V., BELTRAM, F., GIACCA, M. **Nuclear organization and the control of HIV-1 transcription.** *Gene* (326): 1-11, 2004.

MARCELLO, A., ZOPPÉ, M., GIACCA, M. **Multiple Modes of Transcriptional Regulation by the HIV-1 Tat Transactivator.** *Life* (51): 175-181, 2001.

MAY, J.M. **Is ascorbic acid an antioxidant for the plasma membrane?** *The FASEB Journal* (13): 995-1006, 1999.

MAY, J.M., QU, Z.C., WHITESELL, R.R. **Ascorbic acid recycling enhances the antioxidant reserve of human erythrocytes.** *Biochemistry* (34): 12721-12728, 1995.

McCUNE, J. **The Dynamics of CD4+ T-Cell Depletion in HIV Disease.** *Nature. Insight Review Articles* (410): 974-979, 2001.

MEHLHORN, R.J., SUMIDA, S., PACKER, L. **Tocopheroxyl radical persistence and tocopherol consumption in liposomes and vitamin E-enriched rat liver mitochondria and microsomes.** *Journal of Biological Chemistry* (264): 13448-13452, 1989.

MERRIL, J.E., KOYANAGI, Y., CHEN, I.S. **Interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha can be induced from mononuclear phagocytes by HIV type 1 binding to the CD4 receptor.** *Journal of Virology* (63): 4404-4408, 1989.

MESSELE, T., BROUWER, M., GIRMA, M., FONTANET, A.L., MIEDEMA, F., HAMANN, D., DE VIT, T.F.R. **Plasma levels of viro-immunological markers in HIV infected and noninfected Ethiopians: correlation with cell surface activation markers.** *Clinical Immunology* (98): 212-219, 2001.

MEYAARD, L., SCHUITEMAKER, H., MIEDEMA, F. **T-cell dysfunction in HIV infection: energy due to defective antigen-presenting cell function?** *Immunology Today* (14): 161-164, 1993.

MEZZAROMA, I., CARLESIMO, M., PINTER, E., ALARIO, C., SACCO, G., MURATORI, D.S., BERNARDI, M.L., PAGANELLI, R., AIUTI, F. **Long-term evaluation of T cell function after highly active antiretroviral therapy in advanced stage of HIV-1 disease.** *AIDS* (13): 1187-1193, 1999.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Políticas de Saúde, Coordenação nacional de DST/AIDS. **Recomendações para terapia antirretroviral em adultos e adolescentes infectados pelo HIV.** Brasil, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de DST/AIDS. **Crêterios de Definição de Casos de AIDS em Adultos e Crianças, para Fins de Vigilância Epidemiolôgica.** Brasil, 2004.

Mofenson L., Korelitz, J., Meyer I., W.A. **The relationship between serum human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA level, CD4 lymphocyte percent, and long-term mortality risk in HIV-1 infected children.** *The Journal of Infectious Diseases* (175): 1029-1038, 1997.

MOIR, S., LAPOINTE, R., MALASPINA, A., OSTROWSKI, M., COLE, C.E., CHUN, T.W., ADELSBERGER, J., BASELER, M., HWU, P. FAUCI, A.S. **CD40-mediated induction of CD4 and CXCR4 on B-lymphocytes correlates with restricted susceptibility to human immunodeficiency virus type-1 infection: Potential role of B-lymphocytes as a viral reservoir.** *Journal of Virology* (73): 7972-7980, 1999.

MOIR, S., MALASPINA, A., OGWARO, K.M., DONOGHUE, E.T., HALLAHAN, C.W., EHLER, L., LIU, S., ADELSBERGER, J., LAPOINTE, R., HWU, P., BASELER, M., ORENSTEIN, J.M., CHUN, T.A., MICAN, K.A., FAUCI, A.S. **HIV-1 induces phenotypic and functional perturbations of B cells in chronically infected individuals.** *Proceedings of the National Academy of Sciences – USA* (98): 10362-10367, 2001.

MOLLACE, V., NOTTET, H. S.L.M., CLAYETTE, P., TURCO, M. C., MUSCOLI, C., SALVEMINI, D., PERNO, C. F. **Oxidative stress and neuroAIDS: triggers, modulators and novel antioxidants.** *Trends in Neurosciences* (24): 411-416, 2001.

MOORE, K. W., de WAAL M. R., COFFMAN, R. L., O'GARRA, A. **Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor.** *Annual Review of Immunology* (19): 683-765, 2001.

MOORE, R.D., CHAISSON, R.E. **Natural history of HIV infection in the era of combination antiretroviral therapy.** *AIDS* (13): 1933-1942, 1999.

MORRIS, L., BINLEY, J.M., CLAS, B.A., BONHOEFFER, S., ASTIL, T.P., KOST, R., HURLEY, A., CAO, Y., MARCOWITZ, M., HO, D.D., MOORE, J.P. **HIV-1 antigen-specific and nonspecific B cell responses are sensitive to combination antiretroviral therapy.** *Journal of Experimental Medicine* (188): 233-245, 1998.

MÜLLER, F., AUKRUST, P., NORDOY, I., FROLAND, S.S. **Possible role of interleukin-10 and CD-40 ligand expression in the pathogenesis of hypergammaglobulinemia in human immunodeficiency virus infection: modulation of interleukin-10 and Ig production after intravenous Ig infusion.** *Blood* (92): 3721-3729, 1998.

- NAGASE, H., AGEMATSU, K. **Mechanism of Hypergammaglobulinemia by HIV Infection: Circulating Memory B-Cell Reduction with Plasmocytosis.** *Clinical Immunology* (2): 250-259, 2001.
- NAKAJIMA, K., MARTINEZ-MAZA, O., HIRANO, T., BREEN, E.C., NISHANIAN, P.G., SALAZAR-GONZALEZ, J.F., FAHEY, J.L. **Induction of IL-6 production by HIV.** *Journal of Immunology* (142): 531-536, 1989.
- NICHOLSON, D. W., THORNBERRY, N. A. **Caspases: Killer proteases.** *Trends in Biochemical Science* (22): 299-306, 1997.
- NOTERMANS, D.W., DE JONG, J.J., GOUDSMIT, J., BAKKER, M., ROOS, M.T., NIJHOT, L., CREMERS, J., HELTINGS, J.A., DANNER, S.A., DE, RONDE, A. **Potent antiretroviral therapy initiates normalization of hypergammaglobulinemia and a decline in HIV type 1-specific antibody responses.** *AIDS* (17): 1003-1008, 2001.
- OPRAVIL, M., FIERZ, W., MATTER, L., BLASER, J., LUTHY, R. Poor antibody response after tetanus and pneumococcal vaccination in immunocompromised HIV infected patients. *Clinical Experimental Immunology* (84): 185-189, 1991.
- PALELLA, F.J.Jr., DELANEY, K.M., MOORMAN, A.C. LOVELESS, M.O., FUHRER, J., SATTEN, G.A., ASCHMAN, D.J., HOLMBERG, S.D. **Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection.** *New England Journal of Medicine* (338): 853-860, 1998.
- PANTALEO, G., GRAZIOSI, C., FAUCI, A.S. **Mechanisms of Disease: The Immunopathogenesis of Human Immunodeficiency Virus Infection.** *New England Journal of Medicine* (328): 327-335, 1993.
- PAPAGNO, L., SPINA, C.A., MARCHANT, A., SALIO, M., RUFER, N., LITTLE, S., DONG, T., CHESNEY, G., WATERS, A., EASTERBROOK, P., DUNBAR, P.R., SHEPHERD, D., CERUNDOLO, V., EMERY, V., GRIFFITHS, P., CONLON, C., MCMICHIE, A., RICHMAN, D.D., ROWLAND-JONES, S.L., APPAY, V. **Immune activation and CD8+ T Cell differentiation towards senescence in HIV-1 infection.** *Plos Biology* (2): 173-185, 2004.
- PHILLIPS, A.N. **The relationship between beta-2-microglobulin, CD4 lymphocyte count, AIDS and death in HIV-positive individuals.** *Epidemiology and Infection* (118): 259-266, 1997.
- PHILLIPS, A.N., SABIN, C.A., ELFORD, J., BOFILL, M., LEE, C.A., JANOSSY, G. **CD8+ lymphocyte counts and serum immunoglobulin A levels early in HIV infection as predictors of CD4 lymphocyte depletion during 8 years of follow-up.** *AIDS* (7): 975-980, 1993.
- POLI, G., PANTALEO, G., FAUCI, A.S. **Immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection.** *Journal of Clinical Infectious Diseases* (17): 224-229, 1993.
- POULIN, L., PAQUETTE, N., MOIR, S., LAPOINTE, R., DARVEAU, A. **Productive infection of normal CD40-activated human B-lymphocytes by HIV-1.** *AIDS* (8): 1539-1544.
- POLYAK, K., XIA, Y., ZWELER, J.A., KINZLER, K.W., VOGESTEIN, B. **A model for p53- induced apoptosis.** *Nature* (389): 300- 389, 1997.

- QUAN, C.P., WATANABE, S., PAMONSINLAPATHAM, P., BOUVET, J-P. **Different dysregulations of the natural antibody repertoire in treated and untreated HIV-1 patients.** *Journal of Autoimmunity* (17): 81-87, 2001.
- RACHID, M., SCHECHTER, M. **Manual de HIV/AIDS.** 5° Ed. Revinter, 2002.
- RACHID, M., SCHECHTER, M. **Manual de HIV/AIDS.** 6° Ed. Revinter, 2003.
- RAFFANTI, S.P., FUSCO, J.S., SHERRILL, B.H., HANSEN, N.I., JUSTICE, A.C., D'AQUILA, R., MANGIALARDI, W.J., FUSCO, G.P. **Effect of persistent moderate viremia on disease progression during HIV therapy.** *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome* (37): 1147-1154, 2004.
- RELLOSO, M., PUIG-KROGER, S., PELLO, O.M., RODRIGUEZ-FERNANDEZ, J.L., DE LA ROSA, G., LONGO, N., NAVARRO, J., MUNOZ-FERNANDEZ, M.A., SANCHEZ-MATEOS, P., CORBI, A.L. **DC-SIGN (CD209) expression is IL-4 dependent and is negatively regulated by IFN, TGF-beta, and anti-inflammatory agents.** *Journal of Immunology* (168): 2634-2643, 2002.
- RICHMAN, D.D., WRIN, T., LITTLE, S.J., PETROPOULOS, C.J. **Rapid evolution of the neutralizing antibody responses to HIV type 1 infection.** *PNAS* (100): 4144-4149, 2003.
- ROUMIER, T., CASTEDO, M., PERFETTINI, J.L., ANDREAU, K., MÈTIVIER, D., ZAMZAMI, N., KROEMER, G. **Mitochondrion-dependent caspase activation by the HIV-1 envelope.** *Biochemical Pharmacology* (66): 1321-1329, 2003.
- ROUSSET, F., GARCIA, E., DEFRANCE, T., PERONE, C., VEZZIO, N., HSU, D.H., KASTELEIN, R., MOORE, K.W., BANCHEREAU, J. **Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes.** *Science* (89): 1890-1893, 1993.
- SABIN, C.A., DEVEREUX, H., PHILLIPS, A.N., JANOSSY, G., LOVEDAY, C., LEE, C.A. **Immune markers and viral load after HIV-1 seroconversion as predictors of disease progression in a cohort of haemophilic men.** *AIDS* (12): 1347-1352, 1998.
- SAIKUMAR, P., DONG, Z., MIKAILOW, V., DENTON, M., WEINBERG, J.M., VENKATACHALAM, M.A. **Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease.** *American Journal of Medicine* (107): 489-506, 1999.
- SALEH, A., SRINIVASULA, S.M., BALKIR, L., ROBBINS, P. D., ALNEMRI, E.S. **Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70.** *Nature Cell Biology* (2): 476-483, 2000.
- SARIH, M., MAËTAOUI, W., BENSLIMANE, A. **Analysis of apoptosis and a Th1/Th2 phenotype in HIV-infected patients.** *Immunology Letters* (50): 125-129, 1996.
- SAVILL, J., CORPSE, F.V. **Clearance defines the meaning of cell death.** *Nature* (407): 784-788, 2000.
- SCARPA, M., RIGO, A., MAIORINO, M., URSINI, F., GREGOLIN, C. **Formation of  $\alpha$ -tocopherol radical and recycling of  $\alpha$ -tocopherol by ascorbate during peroxidation of phosphatidylcoline liposomes. An electron paramagnetic resonance study.** *Biochemistry and Biophysics. Acta* (801): 215-219, 1984.

- SCHWEDHELM, E., MAAS, R., TROOST, R., BOGER, R.H. **Clinical pharmacokinetics of antioxidants and their impact on systemic oxidative stress.** *Clinical Pharmacokinetics* (42): 437-459, 2003.
- SEMBA, R.D., TANG, A.M. **Micronutrients and the pathogenesis of human immunodeficiency virus infection.** *British Journal of Nutrition* (81): 181-189, 1999.
- SEPULVEDA, R.T., WATSON, R.R. **Treatment of antioxidant deficiencies in AIDS patients.** *Nutrition Research* (22): 27-37, 2002.
- SHI, M., TAYLOR, J.M., FAHEY, J.L., HOOVER, D.R., MUNOZ, A., KINGSLEY, L.A. **Early levels of CD4, neopterin, and beta 2-microglobulin indicate future disease progression.** *Journal of Clinical Immunology* (17): 43-52, 1997.
- SHI, Y. **Mechanisms of Caspase Activation and Inhibition during Apoptosis.** *Nature Molecular Cell* (9): 459-470, 2002.
- SHIRAI, A., COSENTINO, M., LEITMAN-KLINMAN, S.F., KLINMAN, D.M. **Human immunodeficiency virus infection induces both polyclonal and virus-specific B cell activation.** *Journal of Clinical Investigations* (89): 561-566 1992.
- SLATTER, A.F., NOBEL, C.S.I., ORRENIUS, S. **The role of intracellular oxidants in apoptosis.** *Biochemistry and Biophysics* (1271): 62-59, 1995.
- SLEASMAN, J. W., GOODENOW, M. M. **HIV-1 Infection.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (111): S583-S592, 2003.
- SMAILI, S.S., HSU, Y.T., CARVALHO, A.C.P., ROSENSTOCK, T.R., SHARPE, J. C., YOULE, R.L. **Mitochondria, calcium and pro-apoptotic proteins as mediators in cell death signaling.** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* (36): 183-190, 2003.
- SMITH, C.J., SABIN, C.A., LAMPE, F.C., KINLOCH-DE-LOES, S., GUMLEY, H., CARROLL, A., PRINZ, B., YOULE, M., JOHNSON, M.A., PHILIPS, A.N. **The potential for CD4 cell increases in HIV-positive individuals who control viremia with highly active-antiretroviral therapy.** *AIDS* (17): 963-969, 2003.
- SPITS, H. **Development of  $\alpha\beta$  T cells in the human thymus.** *Nature Reviews Immunology* (2): 760-772, 2002.
- SPRIETSMA, J.E. **Cysteine, glutathione (GSH) and zinc and copper ions together are effective, natural, intracellular inhibitors of (AIDS) viruses.** *Medical Hypotheses* (52): 529-538, 1999.
- STAHL, W., SIES, H. **Antioxidant defense: vitamins E and C and carotenoids.** *Diabetes* (2): S 14-8, 1997.
- STASZEWSKI, S. **Efavirenz plus zidovudine and lamiduvine, efavirenz plus indinavir, and indinavir plus zidovudine and lamivudine in the treatment of HIV 1 infection in adults.** *The New England Journal of Medicine* (341): 1865-1873, 1999.
- TAKESHITA, S., BREEN, E. C., IVASCHENKO, M., NISHANIAN, P., KISHIMOTO, T., VREDEVOE, D., MARTINEZ-MAZA, O. **Induction of IL-6 and IL-10 production by recombinant HIV-1 envelope glycoprotein 41 in the THP-1 human monocytic cell line.** *Cell Immunology* (165): 234-242, 1995.
- TANG, A.M., SMIT, E. **Oxidative stress in HIV – 1 infected injection drug users.** *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome (Supl.)*: 12-8, 2000.

- TANGSINMANKONG, N., DAY, N.K., GOOD, R.A., HARAGUSHI, S. **Monocytes are target cells of IL-10 induction by HIV-1 Nef protein.** *Cytokine* (12): 1506-1511, 2000.
- TEEUWSEN, V.J., SIBELINK, K.H., DE WOLF, F., GOUDSMITH, J., UYTDEHAAG, F.G., OSTERHAUS, A.D. **Impairment of in vitro immune responses occurs within 3 months after HIV-1 seroconversion.** *AIDS* (4): 77-81, 1990.
- TOULOUMI, G., HATZAKIS, A. **Natural History of HIV-1 Infection.** *Clinics in Dermatology* (18): 389-399, 2000.
- TRABER, M.G., PACKER, L. **Vitamin E: beyond antioxidant function.** *American Journal of Clinical Nutrition* (62): 1501-1509, 1995.
- TRAMBAS, C.M., GRIFFITHS, G.M. **Delivering the Kiss of death.** *Nature Immunology* (4): 399-403, 2003.
- TRAPANI, J. A., SMYTH, M. J. **Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway.** *Nature Reviews Immunology* (2): 735-747, 2002.
- TREITINGER, A., SPADA, C., VERDI, J.C., MIRANDA, A.F.B., OLIVEIRA, O.V., SILVEIRA, M.V.S., MORIEL, P., ABDALLA, D.S.P. **Decreased antioxidant defense in individuals infected by the human immunodeficiency virus.** *European Journal of Clinical Investigation* (30): 454-459, 2000.
- TRONO, D. **HIV accessory proteins: leading roles for the supporting cast.** *Cell* (82): 189-192, 1995.
- TURNER, B.G., SUMMERS, M.F. **Structural Biology of HIV.** *Journal of Molecular Biology* (285): 1-32, 1999.
- UNAIDS- Joint United Nations Programme on HIV/AIDS, WHO- World Health Organization. **AIDS Epidemic Update.** 04.45E, December 2004.
- VAN DER MEIJDEN, M., GAGE, J., BREEN, E.C., TAGA, T., KISHIMOTO, T., MARTÍNEZ-MAZA, O. **IL-6 receptor (CD126/IL-6R') expression is increased on monocytes and B lymphocytes in HIV infection.** *Cellular Immunology* (190): 156-166, 1998.
- VAUX, D. L., STRASSER, A. **The molecular biology of apoptosis.** *Science* (93): 2239-2244, 1996.
- VERGIS, E.N., MELLORS, J.W. **Natural history of HIV-1 infection.** *Infectious Disease Clinics of North America* (14): 809-825, 2000.
- VERHAGEN, A.M., EKRET, P.G., PAKUSCH, M., SILKE, J., CONNOLLY, L.M., REID, G.E., MORITZ, R.L., SIMPSON, R. J., VAUX, D.L. **Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins.** *Cell* (102): 43-53, 2000.
- WALKER, L.S.K., GULBRANSON-JUDGE, A., FLYNN, S., BROCKER, T., LANE, P.J.L. **Co-stimulation and selection for T-cell help for germinal centres: the role of CD28 and OX40.** *Immunology Today* (21): 333-337, 2000.
- WANG, Y., HUANG, D.S., LIANG, B., WATSON, R.R. **Nutritional status and immune responses in mice with murine AIDS are normalized by vitamin E supplementation.** *Journal of Nutrition* (124): 2024-2032, 1994.

WEISS, R.A. **Gulliver's travels in HIVland.** Nature Insight Perspective (410): 963-967, 2001.

WU, M., DING, H. F., FISHER, D. E. **Apoptosis: Molecular Mechanisms.** Nature Immunology: 1-14, 1999.

WU, M., XU, L.Z., HU, J., ZHAI, Z., SHU, H.B. **Identification of downstream genes up-regulated by the tumor necrosis factor family member TALL-1.** Journal of Leukocyte Biology (544): 410-416, 2002.

WU, Y., MARSH, J.W. **Gene transcription in HIV infection.** Microbes and Infection (5): 1023-1027, 2003.

WYLLIE, A. H. **Apoptosis: an overview.** British Medical Bulletin (53): 451-465, 1997.

YUAN, J., YANKNER, B.A. **Apoptosis in the nervous system.** Nature (407): 802-809, 2000.

ZAMARCHI, R., BARELLI, A., BORRI, A., PTRALIA, G., OMETTO, L., MASIERO, S., CHIECO-BIANCHI, L., AMADORI, A. **B cell activation in peripheral blood and lymph nodes during HIV infection.** AIDS (16): 1217-1226, 2002.

ZHANG, Z., SCHULER, T., ZUPANCIC, M., WIETGREFE, S., STASKUS, K.A., REIMANN, K.A. **Sexual transmission and propagation of SIV and HIV in resting and activated CD4+ T cells.** Science (286): 1353-1357, 1999.

## **APÊNDICES**

**APÊNDICE 1. Tabelas dos resultados estatísticos dos marcadores avaliados**

**Tabela 3.** Níveis basais de linfócitos CD4/mm<sup>3</sup> e após 60, 120 e 180 dias de iniciados os tratamentos, nos grupos controle e suplementado.

Tempo (dias)	Grupo Controle N = 20				Grupo Ascorbato N = 13				Grupo $\alpha$ -tocoferol N = 14			
	Média	Desvio Padrão	Valor Mínimo	Valor Máximo	Média	Desvio Padrão	Valor Mínimo	Valor Máximo	Média	Desvio Padrão	Valor Mínimo	Valor Máximo
0	276,55 <sup>a</sup>	154,38	45	639	257 <sup>a</sup>	168,263	41	639	190,46 <sup>a</sup>	117,118	14	382
60	343,37 <sup>b</sup>	214,775	57	793	393,29 <sup>b</sup>	270,094	111	1057	342,08 <sup>b</sup>	188,036	156	855
120	392,55 <sup>b</sup>	206,621	96	808	361,57 <sup>b</sup>	211,604	138	890	294,33 <sup>b</sup>	129,656	103	540
180	430,55 <sup>b</sup>	234,733	125	885	379 <sup>b</sup>	224,77	62	870	313,73 <sup>b</sup>	174,437	81	621

Análise de Variância para as hipóteses  $H_0$ :

Não existe diferença entre os tempos:  $p=0,0001$

Não existe diferença entre os tratamentos ao longo do tempo:  $p=0,842$

Letras diferentes indicam diferenças significativas,  $p < 0.05$

N = Número de pacientes estudados

**Tabela 4.** Níveis basais de linfócitos CD8/mm<sup>3</sup> e após 60, 120 e 180 dias de iniciados os tratamentos, nos grupos controle e suplementado.

Tempo (dias)	Grupo Controle N = 20				Grupo Ascorbato N = 13				Grupo $\alpha$ -tocoferol N = 14			
	Média*	Desvio Padrão	Valor Mínimo	Valor Máximo	Média*	Desvio Padrão	Valor Mínimo	Valor Máximo	Média*	Desvio Padrão	Valor Mínimo	Valor Máximo
0	863,2 <sup>a</sup>	444,273	380	1987	1075,08 <sup>a</sup>	768,949	216	2938	898,43 <sup>a</sup>	446,602	264	1987
60	794,42 <sup>a</sup>	350,187	373	1614	1074,67 <sup>a</sup>	595,18	417	2453	719,36 <sup>a</sup>	281,1	432	1557
120	826,4 <sup>a</sup>	289,947	300	1316	969,58 <sup>a</sup>	657,674	178	2168	782,21 <sup>a</sup>	386,284	439	1691
180	820,25 <sup>a</sup>	212,841	487	1414	1001,36 <sup>a</sup>	614,387	342	2428	803,64 <sup>a</sup>	375,046	372	1741

Análise de Variância para as hipóteses  $H_0$ :

Não existe diferença entre os tempos:  $p=0,109$

Não existe diferença entre os tratamentos ao longo do tempo:  $p=0,584$

Comparações múltiplas entre os tempos, em cada tratamento avaliado, através do Contraste de Diferença. \*Letras diferentes indicam diferenças significativas,  $p < 0.05$

N = Número de pacientes estudados

**Tabela 5.** Relação CD4/CD8 nos tempos 0, 60, 120 e 180 dias de iniciados os tratamentos, nos grupos controle e suplementado.

Tempo (dias)	Grupo Controle N = 20				Grupo Ascorbato N = 13				Grupo $\alpha$ -tocoferol N = 14			
	Média*	Desvio Padrão	Valor Mínimo	Valor Máximo	Média*	Desvio Padrão	Valor Mínimo	Valor Máximo	Média*	Desvio Padrão	Valor Mínimo	Valor Máximo
0	0,347 <sup>a</sup>	0,18198	0,1	0,87	0,2523 <sup>a</sup>	0,20981	0,01	0,74	0,2857 <sup>a</sup>	0,13642	0,05	0,87
60	0,4668 <sup>b</sup>	0,22005	0,09	0,89	0,4092 <sup>b</sup>	0,26456	0,13	0,85	0,5321 <sup>b</sup>	0,26522	0,15	0,98
120	0,495 <sup>b</sup>	0,22719	0,11	0,89	0,4725 <sup>b</sup>	0,32806	0,05	1,02	0,5079 <sup>b</sup>	0,25387	0,08	1,02
180	0,52 <sup>b</sup>	0,2526	0,1	1	0,439 <sup>b</sup>	0,3072	0,01	0,9	0,52 <sup>b</sup>	0,252	0,1	0,97

Análise de Variância para as hipóteses  $H_0$ :

Não existe diferença entre os tempos:  $p=0,0001$

Não existe diferença entre os tratamentos ao longo do tempo:  $p=0,954$

Comparações múltiplas entre os tempos, em cada tratamento avaliado, através do Contraste de Diferença. \*Letras diferentes indicam diferenças significativas,  $p < 0.05$

N = Número de pacientes estudados

**Tabela 6.** Percentual de linfócitos viáveis nos tempos 0, 60, 120 e 180 dias de iniciados os tratamentos, nos grupos controle e suplementado.

Tempo (dias)	Grupo Controle N = 20				Grupo Ascorbato N = 13				Grupo $\alpha$ -tocoferol N = 14			
	Média*	Desvio Padrão	Valor Mínimo	Valor Máximo	Média*	Desvio Padrão	Valor Mínimo	Valor Máximo	Média*	Desvio Padrão	Valor Mínimo	Valor Máximo
0	30,063 <sup>a</sup>	23,341	2,5	84,9	47,847 <sup>a</sup>	22,4752	5,1	78,6	21,826 <sup>a</sup>	15,2273	2,5	53,4
60	40,817 <sup>b</sup>	21,12459	11,15	78,58	66,6869 <sup>b</sup>	18,34583	33,45	86,84	25,6008 <sup>b</sup>	13,16315	2,75	46,26
120	47,015 <sup>b</sup>	26,2283	11	89,4	77,693 <sup>c</sup>	15,9064	36,7	93,2	28,701 <sup>b</sup>	14,6731	8,9	56,3
180	51,9655 <sup>b</sup>	22,50705	15,06	87,69	80,6283 <sup>d</sup>	18,24006	24,68	91,03	54,7921 <sup>c</sup>	23,20693	13,25	81,09

Análise de Variância para as hipóteses  $H_0$ :

Não existe diferença entre os tempos:  $p=0,0001$

Não existe diferença entre os tratamentos ao longo do tempo:  $p=0,002$

Comparações múltiplas entre os tempos, em cada tratamento avaliado, através do Contraste de Diferença. \* Letras diferentes indicam diferenças significativas,  $p < 0.05$

N = Número de pacientes estudados

**Tabela 7.** Percentual de linfócitos em apoptose nos tempos 0, 60, 120 e 180 dias de iniciados os tratamentos, nos grupos controle e suplementado.

Tempo (dias)	Grupo Controle N = 20				Grupo Ascorbato N = 13				Grupo $\alpha$ -tocoferol N = 14			
	Média*	Desvio Padrão	Valor Mínimo	Valor Máximo	Média*	Desvio Padrão	Valor Mínimo	Valor Máximo	Média*	Desvio Padrão	Valor Mínimo	Valor Máximo
0	60,41 <sup>a</sup>	20,15	14,38	88,14	48,81 <sup>a</sup>	20,49	17,87	88,22	72,68 <sup>a</sup>	15,30	42,60	95,47
60	52,27 <sup>b</sup>	20,38	19,20	84,60	30,40 <sup>b</sup>	16,31	12,60	62,70	70,59 <sup>b</sup>	13,57	44,51	93,53
120	42,32 <sup>b</sup>	21,85	9,30	80,90	16,27 <sup>c</sup>	9,49	5,00	40,10	66,76 <sup>b</sup>	15,80	40,15	88,47
180	42,63 <sup>b</sup>	19,90	11,86	82,95	18,49 <sup>c</sup>	17,99	8,21	73,82	40,09 <sup>c</sup>	22,23	15,14	82,84

Análise de Variância para as hipóteses  $H_0$ :

Não existe diferença entre os tempos:  $p=0,0001$

Não existe diferença entre os tratamentos ao longo do tempo:  $p=0,0001$

Comparações múltiplas entre os tempos, em cada tratamento avaliado, através do Contraste de Diferença. \*Letras diferentes indicam diferenças significativas,  $p < 0.05$

N = Número de pacientes estudados

**Tabela 8.** Percentual de linfócitos mortos nos tempos 0, 60, 120 e 180 dias de iniciados os tratamentos, nos grupos controle e suplementado.

Tempo (dias)	Grupo Controle N = 20				Grupo Ascorbato N = 13				Grupo $\alpha$ -tocoferol N = 14			
	Média	Desvio Padrão	Valor Mínimo	Valor Máximo	Média	Desvio Padrão	Valor Mínimo	Valor Máximo	Média	Desvio Padrão	Valor Mínimo	Valor Máximo
0	9,38 <sup>a</sup>	7,89	0,76	25,81	3,99 <sup>a</sup>	2,10	1,12	9,06	5,28 <sup>a</sup>	2,72	1,89	11,2
60	6,85 <sup>b</sup>	6,39	0,42	24,98	2,87 <sup>b</sup>	2,84	0,18	10,46	3,81 <sup>b</sup>	2,44	0,92	9,2
120	10,41 <sup>b</sup>	9,78	0,40	34,7	6,02 <sup>a</sup>	15,75	0,40	58,30	4,32 <sup>a</sup>	2,57	1,64	9,3
180	5,42 <sup>b</sup>	5,75	0,45	21,91	0,97 <sup>b</sup>	0,54	0,31	2,44	5,12 <sup>b</sup>	4,70	1,19	20,5

Análise de Variância para as hipóteses  $H_0$ :

Não existe diferença entre os tempos:  $p=0,04$

Não existe diferença entre os tratamentos ao longo do tempo:  $p=0,125$

Comparações múltiplas entre os tempos, em cada tratamento avaliado, através do Contraste de Diferença. \*Letras diferentes indicam diferenças significativas,  $p < 0.05$

N = Número de pacientes estudados

**Tabela 9.** Níveis basais de IgA (mg/dl) e após 60, 120 e 180 dias de iniciados os tratamentos, nos grupos controle e suplementado.

Tempo (dias)	Grupo Controle N = 20				Grupo Ascorbato N = 13				Grupo $\alpha$ -tocoferol N = 14			
	Média	Desvio Padrão	Valor Mínimo	Valor Máximo	Média	Desvio Padrão	Valor Mínimo	Valor Máximo	Média	Desvio Padrão	Valor Mínimo	Valor Máximo
0	311,10 <sup>a</sup>	206,34	119	877	352,69 <sup>a</sup>	178,32	107	812	422 <sup>a</sup>	374,5	134	1.510
60	286,25 <sup>b</sup>	174,96	103	730	385,69 <sup>a</sup>	289,41	86	1123	383 <sup>b</sup>	313,3	123	1.320
120	240,25 <sup>b</sup>	139,77	27	510	301,31 <sup>b</sup>	167,16	80	704	348 <sup>b</sup>	291,4	109	1.190
180	263,73 <sup>b</sup>	117,92	105	484	323,14 <sup>b</sup>	228,82	61	967	324 <sup>b</sup>	256,3	96	1.030

Análise de Variância para as hipóteses  $H_0$ :

Não existe diferença entre os tempos:  $p=0,002$

Não existe diferença entre os tratamentos ao longo do tempo:  $p=0,077$

Comparações múltiplas entre os tempos, em cada tratamento avaliado, através do Contraste de Diferença. \*Letras diferentes indicam diferenças significativas,  $p < 0.05$

N = Número de pacientes estudados

**Tabela 10.** Níveis basais de IgG (mg/dl) e após 60, 120 e 180 dias de iniciados os tratamentos, nos grupos controle e suplementado.

Tempo (dias)	Grupo Controle N = 20				Grupo Ascorbato N = 13				Grupo $\alpha$ -tocoferol N = 14			
	Média*	Desvio Padrão	Valor Mínimo	Valor Máximo	Média*	Desvio Padrão	Valor Mínimo	Valor Máximo	Média*	Desvio Padrão	Valor Mínimo	Valor Máximo
0	2168,40 <sup>a</sup>	746,57	671	3450	2306,69 <sup>a</sup>	771,34	1480	4116	2.195 <sup>a</sup>	808,2	971	3.680
60	1733,10 <sup>b</sup>	445,52	981	2490	2042,38 <sup>b</sup>	722,60	1130	4040	1.824 <sup>b</sup>	584,6	936	3.110
120	1647,25 <sup>b</sup>	485,38	748	2640	1843,85 <sup>b</sup>	612,29	1110	3252	1.763 <sup>b</sup>	472,0	1.000	2.530
180	1699,20 <sup>b</sup>	448,95	767	2810	1730,08 <sup>b</sup>	446,07	940	2803	1.730 <sup>b</sup>	452,3	985	2.570

Análise de Variância para as hipóteses  $H_0$ :

Não existe diferença entre os tempos:  $p=0,0001$

Não existe diferença entre os tratamentos ao longo do tempo:  $p=0,567$

Comparações múltiplas entre os tempos, em cada tratamento avaliado, através do Contraste de Diferença. \*Letras diferentes indicam diferenças significativas,  $p < 0.05$

N = Número de pacientes estudados

**Tabela 11.** Níveis basais de IgM (mg/dl) e após 60, 120 e 180 dias de iniciados os tratamentos, nos grupos controle e suplementado.

Tempo (dias)	Grupo Controle N = 15				Grupo Ascorbato N =				Grupo $\alpha$ -tocoferol N = 14			
	Média	Desvio Padrão	Valor Mínimo	Valor Máximo	Média	Desvio Padrão	Valor Mínimo	Valor Máximo	Média	Desvio Padrão	Valor Mínimo	Valor Máximo
0	179,25 <sup>a</sup>	75,33	28	298	175,46 <sup>a</sup>	84,71	88	366	193,4 <sup>a</sup>	94,9	79,6	350
60	126,89 <sup>b</sup>	52,46	43	254	120,77 <sup>b</sup>	42,28	36	205	150,1 <sup>b</sup>	74,9	39,8	282
120	114,28 <sup>b</sup>	57,29	39	228	114,31 <sup>b</sup>	66,48	52	295	150,9 <sup>b</sup>	88,1	42	386
180	132,35 <sup>b</sup>	74,33	50	350	92,38 <sup>b</sup>	36,50	41	177	137,4 <sup>b</sup>	55,7	50	243

Análise de Variância para as hipóteses  $H_0$ :

Não existe diferença entre os tempos:  $p = 0,0001$

Não existe diferença entre os tratamentos ao longo do tempo:  $p = 0,511$

Letras diferentes indicam diferenças significativas,  $p < 0.05$

N = Número de pacientes estudados

**Tabela 12.** Níveis basais de  $\beta 2$ -Microglobulina (ng/dl) e após 60, 120 e 180 dias de iniciados os tratamentos, nos grupos controle e suplementado.

Tempo (dias)	Grupo Controle N = 20				Grupo Ascorbato N = 13				Grupo $\alpha$ -tocoferol N = 14			
	Média	Desvio Padrão	Valor Mínimo	Valor Máximo	Média	Desvio Padrão	Valor Mínimo	Valor Máximo	Média	Desvio Padrão	Valor Mínimo	Valor Máximo
0	3049,90 <sup>a</sup>	812,03	1796	5393	2561,77 <sup>a</sup>	1076,80	604	4406	3349,64 <sup>a</sup>	1249,62	1976	6332
60	2406 <sup>b</sup>	470,23	1341	3268	1856 <sup>b</sup>	346,09	1004	2277	2457,86 <sup>b</sup>	806,75	1177	3637
120	2511,10 <sup>b</sup>	825,82	1308	4463	2208,92 <sup>b</sup>	1788,75	1144	7960	2711,14 <sup>b</sup>	808,18	1607	4346
180	2008,25 <sup>b</sup>	478,42	1132	3018	1568,42 <sup>b</sup>	519,60	964	2400	2898,57 <sup>b</sup>	1209,75	1609	6396

Análise de Variância para as hipóteses  $H_0$ :

Não existe diferença entre os tempos:  $p = 0,0001$

Não existe diferença entre os tratamentos ao longo do tempo:  $p = 0,120$

Letras diferentes indicam diferenças significativas,  $p < 0.05$

N = Número de pacientes estudados

**APÊNDICE 2. Quadros dos resultados dos marcadores avaliados, por paciente, dos grupos Placebo e Ascorbato**

**Quadro 1.** Níveis plasmáticos de RNA do HIV-1 (cópias/ml) nos pacientes soropositivos para o HIV submetidos à TARV, nos tempos 0, 60, 120 e 180 dias após o início dos tratamentos, nos grupos controle e suplementados.

Paciente	Grupo Controle N = 20 Tempo (dias)				Paciente	Grupo Ascorbato N = 13 Tempo (dias)				Paciente	Grupo $\alpha$ -tocoferol N = 14 Tempo (dias)			
	0	60	120	180		0	60	120	180		0	60	120	180
4	64.000	80	840	410	78	140.000	6.000	26.000	25.000	1	140.000	1.000	230	9.000
10	100.000	1.100	80	930	81	130.000	180.000	-	-	11	170.000	1.400	1.800	130
12	72.000	80	80	180	83	31.000	80	80	80	14	55.000	6.300	240	80
16	110.000	5.300	780	4.300	88	490.000	150	80	80	15	110.000	1.500	80	80
24	190.000	6.800	80	560	89	22.000	80	80	80	17	45.000	1.800	1.400	1.400
25	48.000	1.600	80	80	90	16.000	80	80	510	22	310.000	1.200	1.400	310
29	80.000	4.100	370	4.600	91	110.000	80	80	80	23	110.000	7.900	1.200	760
32	290.000	5.400	4.900	350	92	14.000	18.000	6.700	27.000	26	58.000	28.000	14.000	3.400
33	430.000	9.000	430	460	94	520.000	80	80	95.000	28	200.000	480	310	310
36	110.000	1.600	1.400	1.300	102	310.000	510	4.600	1.300	30	170.000	1.300	1.300	80
37	61.000	1.100	1.200	670	104	62.000	80	80	80	31	63.000	3.800	80	160
45	55.000	2.500	1.400	2.000	108	3.400	80	80	80	35	25.000	730	1.200	1.200
46	75.000	12.000	370	160	110	90.000	10.000	61.000	190.000	44	84.000	4.000	310	80
56	720.000	80	120	1.100						47	48.000	1.100	4.100	1.200
57	110.000	2.300	850	770										
77	2.700	80	42.000	5.800										
79	6.500	80	80	80										
80	19.000	10.000	160	100.000										
87	97.000	80	80	80										
120	29.000	80	80	80										
<b>Média</b>	<b>133460,00</b>	<b>3168,00</b>	<b>2769,00</b>	<b>6195,50</b>	<b>Média</b>	<b>149107,69</b>	<b>16558,46</b>	<b>8245,00</b>	<b>28274,17</b>	<b>Média</b>	<b>113428,57</b>	<b>4322,14</b>	<b>1975,00</b>	<b>1377,14</b>
<b>DP</b>	<b>170846,82</b>	<b>3725,45</b>	<b>9298,00</b>	<b>22142,26</b>	<b>DP</b>	<b>177956,50</b>	<b>49409,82</b>	<b>18209,24</b>	<b>57908,90</b>	<b>DP</b>	<b>78418,71</b>	<b>7171,31</b>	<b>3618,83</b>	<b>2378,60</b>

N = número de pacientes, DP = Desvio Padrão

**Quadro 2.** Número de linfócitos CD4/mm<sup>3</sup> nos pacientes soropositivos para o HIV submetidos à TARV, nos tempos 0, 60, 120 e 180 dias após o início dos tratamentos, nos grupos controle e suplementados.

Paciente	Grupo Controle N = 20 Tempo (dias)				Paciente	Grupo Ascorbato N = 13 Tempo (dias)				Paciente	Grupo $\alpha$ -tocoferol N = 14 Tempo (dias)			
	0	60	120	180		0	60	120	180		0	60	120	180
	4	123	149	140		190	78	74	157		157	137	1	255
10	124	213	206	180	81	189	252	-	-	11	342	771	627	773
12	446	647	582	554	83	196	406	316	223	14	449	355	330	392
16	420	-	728	749	88	14	226	263	-	15	45	152	201	232
24	190	284	420	274	89	247	483	440	621	17	241	495	364	474
25	291	271	498	762	90	152	156	167	230	22	64	111	138	62
29	471	784	517	545	91	298	340	381	454	23	639	1.057	890	870
32	241	267	251	346	92	23	-	103	81	26	321	432	226	279
33	236	394	346	471	94	131	247	214	211	28	268	281	460	360
36	45	57	96	125	102	160	353	413	339	30	88	225	195	215
37	487	619	737	825	104	382	855	540	590	31	41	154	146	157
45	298	300	410	394	108	241	295	290	276	35	366	157	420	409
46	230	272	291	346	110	369	335	248	289	44	201	480	495	396
56	413	388	415	336						47	291	578	386	483
57	639	793	808	885										
77	166	185	189	187										
79	219	273	281	293										
80	115	107	141	157										
87	171	301	457	593										
120	206	220	338	399										
Média	276,55	361,95	392,55	430,05	Média	190,46	320,77	294,33	313,73	Média	257,93	393,29	361,57	379,00
DP	154,38	224,96	206,62	235,28	DP	117,12	195,75	129,66	174,44	DP	168,26	270,09	211,60	224,77

N = número de pacientes

DP = Desvio Padrão

**Quadro 3.** Número de linfócitos CD8/mm<sup>3</sup> nos pacientes soropositivos para o HIV submetidos à TARV, nos tempos 0, 60, 120 e 180 dias após o início dos tratamentos, nos grupos controle e suplementados.

Paciente	Grupo Controle N = 20 Tempo (dias)				Paciente	Grupo Ascorbato N = 13 Tempo (dias)				Paciente	Grupo $\alpha$ -tocoferol N = 14 Tempo (dias)			
	0	60	120	180		0	60	120	180		0	60	120	180
4	747	392	300	624	78	668	1.256	1.117	937	1	777	941	613	604
10	559	952	700	692	81	1.598	1.628	-	-	11	847	786	985	938
12	1.109	800	682	683	83	542	767	740	601	14	900	607	470	589
16	482	-	1.010	891	88	230	550	681	-	15	432	545	789	590
24	481	770	1.235	679	89	796	837	575	812	17	1.190	629	480	734
25	808	705	707	775	90	1.030	907	178	896	22	1.308	745	1.691	1.741
29	1.461	1.494	718	881	91	2.938	2.453	2.150	1.640	23	1.987	1.557	1.227	1.253
32	1.190	646	988	908	92	1.983	-	2.168	2.428	26	731	860	557	706
33	532	778	619	959	94	1.588	1.698	1.561	1.444	28	612	489	624	372
36	432	626	692	929	102	216	417	403	388	30	400	432	629	563
37	841	698	825	856	104	907	1.050	823	756	31	264	502	439	525
45	919	613	920	729	108	619	511	460	342	35	1.242	645	1.348	1.278
46	380	444	403	487	110	861	822	779	771	44	1.080	723	627	734
56	1.688	1.305	1.316	887						47	808	610	472	624
57	1.987	1.614	1.270	1.414										
77	753	703	709	741										
79	774	438	655	646										
80	1.120	1.029	1.302	954										
87	496	714	912	1.139										
120	505	373	565	531										
Média	<b>863,20</b>	<b>782,20</b>	<b>826,40</b>	<b>820,25</b>	Média	<b>1075,08</b>	<b>1230,46</b>	<b>969,58</b>	<b>1001,36</b>	Média	<b>898,43</b>	<b>719,36</b>	<b>782,21</b>	<b>803,64</b>
DP	<b>444,27</b>	<b>345,20</b>	<b>289,95</b>	<b>212,84</b>	DP	<b>768,95</b>	<b>800,16</b>	<b>657,67</b>	<b>614,39</b>	DP	<b>446,60</b>	<b>281,10</b>	<b>386,28</b>	<b>375,05</b>

N = número de pacientes

DP = Desvio Padrão

**Quadro 4.** Relação CD4/CD8 nos pacientes soropositivos para o HIV submetidos à TARV, nos tempos 0, 60, 120 e 180 dias após o início dos tratamentos, nos grupos controle e suplementados.

Paciente	Grupo Controle N = 20 Tempo (dias)				Paciente	Grupo Ascorbato N = 13 Tempo (dias)				Paciente	Grupo $\alpha$ -tocoferol N = 14 Tempo (dias)			
	0	60	120	180		0	60	120	180		0	60	120	180
	<b>4</b>	0,16	0,38	0,47		0,3	<b>78</b>	0,11	0,13		0,14	0,2	<b>1</b>	0,33
<b>10</b>	0,22	0,22	0,30	0,3	<b>81</b>	0,12	0,15	-	-	<b>11</b>	0,40	0,98	0,64	0,8
<b>12</b>	0,40	0,81	0,85	0,8	<b>83</b>	0,36	0,53	0,43	0,4	<b>14</b>	0,50	0,58	0,70	0,7
<b>16</b>	0,87	-	0,72	0,8	<b>88</b>	0,06	0,41	0,39	-	<b>15</b>	0,10	0,28	0,25	0,4
<b>24</b>	0,40	0,37	0,34	0,4	<b>89</b>	0,31	0,58	0,77	0,8	<b>17</b>	0,20	0,79	0,76	0,7
<b>25</b>	0,36	0,74	0,70	1,0	<b>90</b>	0,15	0,17	0,94	0,3	<b>22</b>	0,05	0,15	0,08	0,0
<b>29</b>	0,32	0,52	0,72	0,5	<b>91</b>	0,10	0,14	0,18	0,3	<b>23</b>	0,32	0,68	0,73	0,7
<b>32</b>	0,26	0,41	0,25	0,4	<b>92</b>	0,01	-	0,05	0,0	<b>26</b>	0,44	0,50	0,41	0,4
<b>33</b>	0,44	0,51	0,58	0,5	<b>94</b>	0,08	0,15	0,14	0,2	<b>28</b>	0,44	0,57	0,74	1,0
<b>36</b>	0,10	0,09	0,14	0,1	<b>102</b>	0,74	0,85	1,02	0,9	<b>30</b>	0,22	0,52	0,31	0,4
<b>37</b>	0,58	0,89	0,89	1,0	<b>104</b>	0,42	0,81	0,66	0,8	<b>31</b>	0,16	0,31	0,33	0,3
<b>45</b>	0,32	0,49	0,45	0,5	<b>108</b>	0,39	0,58	0,63	0,8	<b>35</b>	0,29	0,24	0,25	0,3
<b>46</b>	0,61	0,61	0,72	0,7	<b>110</b>	0,43	0,41	0,32	0,4	<b>44</b>	0,19	0,66	0,79	0,5
<b>56</b>	0,24	0,30	0,32	0,4						<b>47</b>	0,36	0,95	0,82	0,8
<b>57</b>	0,32	0,54	0,54	0,6										
<b>77</b>	0,22	0,26	0,27	0,3										
<b>79</b>	0,28	0,62	0,43	0,5										
<b>80</b>	0,10	0,10	0,11	0,2										
<b>87</b>	0,34	0,42	0,50	0,5										
<b>120</b>	0,40	0,59	0,60	0,8										
<b>Média</b>	<b>0,34</b>	<b>0,50</b>	<b>0,50</b>	<b>0,52</b>	<b>Média</b>	<b>0,25</b>	<b>0,38</b>	<b>0,47</b>	<b>0,44</b>	<b>Média</b>	<b>0,29</b>	<b>0,53</b>	<b>0,51</b>	<b>0,52</b>
<b>DP</b>	<b>0,18</b>	<b>0,27</b>	<b>0,23</b>	<b>0,25</b>	<b>DP</b>	<b>0,21</b>	<b>0,28</b>	<b>0,33</b>	<b>0,31</b>	<b>DP</b>	<b>0,14</b>	<b>0,27</b>	<b>0,25</b>	<b>0,25</b>

N = número de pacientes

DP = Desvio Padrão

**Quadro 5.** Percentual de linfócitos viáveis, nos pacientes soropositivos para o HIV submetidos à TARV, nos tempos 0, 60, 120 e 180 dias após o início dos tratamentos, nos grupos controle e suplementados.

Paciente	Grupo Controle				Paciente	Grupo Ascorbato				Paciente	Grupo $\alpha$ -tocoferol			
	N = 20					N = 13					N = 14			
	Tempo (dias)					Tempo (dias)					Tempo (dias)			
	0	60	120	180		0	60	120	180		0	60	120	180
<b>4</b>	20,6	49,47	49,7	51,21	<b>78</b>	5,1	53,81	54,7	24,68	<b>1</b>	26,9	-	-	81,09
<b>10</b>	5,9	18,35	17,5	35,78	<b>81</b>	30,7	40,10	36,7	-	<b>11</b>	32,5	12,06	19,0	18,89
<b>12</b>	55,6	56,28	58,7	62,27	<b>83</b>	34,6	33,45	73,1	75,83	<b>14</b>	2,5	-	-	36,65
<b>16</b>	3,6	38,66	49,5	31,76	<b>88</b>	52,2	61,02	80,0	82,93	<b>15</b>	12,7	33,50	38,0	33,80
<b>24</b>	23,8	49,85	54,4	54,49	<b>89</b>	47,1	83,92	88,6	91,03	<b>17</b>	53,4	37,16	15,2	81,06
<b>25</b>	18,9	21,81	21,7	23,03	<b>90</b>	45,6	47,16	77,4	77,70	<b>22</b>	4,5	46,26	35,1	54,90
<b>29</b>	26,5	11,98	-	68,42	<b>91</b>	74,4	84,28	83,8	89,21	<b>23</b>	12,3	2,75	8,9	58,16
<b>32</b>	4,7	14,67	11,0	18,03	<b>92</b>	54,1	63,04	80,1	89,49	<b>26</b>	42,1	19,71	17,7	58,08
<b>33</b>	10,5	11,15	-	63,53	<b>94</b>	77,2	71,87	75,3	88,06	<b>28</b>	25,0	32,41	38,3	78,80
<b>36</b>	30,7	36,62	47,2	54,51	<b>102</b>	54,9	78,21	87,2	85,19	<b>30</b>	34,9	28,35	47,4	13,25
<b>37</b>	27,3	35,29	24,9	24,74	<b>104</b>	14,5	86,84	93,2	88,50	<b>31</b>	25,7	34,76	56,3	67,06
<b>45</b>	52,5	30,72	20,5	48,57	<b>108</b>	78,6	84,51	90,2	88,12	<b>35</b>	15,8	21,82	21,3	36,92
<b>46</b>	51,5	47,35	27,2	73,22	<b>110</b>	53,0	78,72	89,7	86,80	<b>44</b>	4,2	6,78	32,7	71,74
<b>56</b>	4,8	38,57	56,1	37,97						<b>47</b>	13,1	31,65	15,4	76,69
<b>57</b>	2,5	16,04	21,5	15,06										
<b>77</b>	33,8	67,75	41,8	59,91										
<b>79</b>	84,9	78,58	87,2	87,69										
<b>80</b>	24,8	58,29	83,0	57,19										
<b>87</b>	56,7	59,41	89,4	86,51										
<b>120</b>	61,7	75,50	87,4	85,42										
<b>Média</b>	<b>30,06</b>	<b>40,82</b>	<b>47,15</b>	<b>51,97</b>	<b>Média</b>	<b>47,85</b>	<b>66,69</b>	<b>77,69</b>	<b>80,63</b>	<b>Média</b>	<b>22,05</b>	<b>25,60</b>	<b>28,78</b>	<b>55,51</b>
<b>DP</b>	<b>23,34</b>	<b>21,12</b>	<b>26,23</b>	<b>22,51</b>	<b>DP</b>	<b>22,48</b>	<b>18,35</b>	<b>15,91</b>	<b>18,24</b>	<b>DP</b>	<b>15,11</b>	<b>13,16</b>	<b>14,67</b>	<b>24,21</b>

N = número de pacientes

DP = Desvio Padrão

**Quadro 6.** Percentual de linfócitos em apoptose, nos pacientes soropositivos para o HIV submetidos à TARV, nos tempos 0, 60, 120 e 180 dias após o início dos tratamentos, nos grupos controle e suplementados.

Paciente	Grupo Controle N = 20 Tempo (dias)				Paciente	Grupo Ascorbato N = 13 Tempo (dias)				Paciente	Grupo $\alpha$ -tocoferol N = 14 Tempo (dias)			
	0	60	120	180		0	60	120	180		0	60	120	180
<b>4</b>	59,64	45,6	45,6	44,08	<b>78</b>	88,22	39,8	40,1	73,82	<b>1</b>	64,34	-	-	15,14
<b>10</b>	77,27	74,0	69,2	58,90	<b>81</b>	60,25	49,4	5,0	-	<b>11</b>	60,65	77,0	49,3	78,02
<b>12</b>	38,22	38,1	37,3	35,69	<b>83</b>	62,44	62,7	23,8	21,74	<b>14</b>	95,47	-	-	59,29
<b>16</b>	86,58	44,6	37,8	54,21	<b>88</b>	42,65	36,2	19,0	16,50	<b>15</b>	81,50	71,2	82,8	59,31
<b>24</b>	68,06	47,0	34,4	36,40	<b>89</b>	47,71	15,0	10,4	8,21	<b>17</b>	42,60	60,9	82,3	15,70
<b>25</b>	73,77	73,7	64,1	74,88	<b>90</b>	50,39	50,0	20,6	21,99	<b>22</b>	91,45	44,5	56,5	38,70
<b>29</b>	72,14	83,1	-	28,71	<b>91</b>	24,45	15,6	14,5	9,82	<b>23</b>	82,85	93,5	88,5	37,87
<b>32</b>	75,49	72,8	80,9	71,12	<b>92</b>	43,58	33,8	19,3	9,81	<b>26</b>	53,03	75,6	75,8	36,09
<b>33</b>	88,14	84,6	-	34,88	<b>94</b>	28,81	26,4	22,7	11,05	<b>28</b>	67,88	65,0	58,1	17,22
<b>36</b>	66,53	63,0	46,9	40,52	<b>102</b>	41,66	19,0	11,6	13,61	<b>30</b>	60,51	70,0	50,0	82,84
<b>37</b>	46,89	39,7	54,0	53,35	<b>104</b>	81,71	12,6	6,3	10,75	<b>31</b>	70,77	58,8	40,2	31,50
<b>45</b>	38,93	53,3	44,8	48,71	<b>108</b>	17,87	14,8	9,4	11,47	<b>35</b>	76,99	73,3	71,2	42,61
<b>46</b>	42,16	46,8	48,0	22,03	<b>110</b>	44,87	20,0	9,1	13,16	<b>44</b>	84,64	91,9	65,5	27,07
<b>56</b>	81,28	50,0	21,4	47,82						<b>47</b>	84,88	65,5	81,0	19,94
<b>57</b>	73,24	82,7	73,6	82,95										
<b>77</b>	54,21	30,4	53,7	37,88										
<b>79</b>	14,38	20,1	12,4	11,86										
<b>80</b>	73,61	37,7	16,6	42,35										
<b>87</b>	41,02	39,1	9,3	12,54										
<b>120</b>	36,67	19,2	11,9	13,82										
<b>Média</b>	<b>60,41</b>	<b>52,27</b>	<b>42,30</b>	<b>42,61</b>	<b>Média</b>	<b>48,82</b>	<b>30,40</b>	<b>16,28</b>	<b>18,49</b>	<b>Média</b>	<b>72,68</b>	<b>70,59</b>	<b>66,76</b>	<b>40,09</b>
<b>DP</b>	<b>20,16</b>	<b>20,39</b>	<b>21,85</b>	<b>19,92</b>	<b>DP</b>	<b>20,49</b>	<b>16,31</b>	<b>9,50</b>	<b>17,99</b>	<b>DP</b>	<b>15,30</b>	<b>13,57</b>	<b>15,80</b>	<b>22,23</b>

N = número de pacientes

DP = Desvio Padrão

**Quadro 7.** Percentual de linfócitos mortos, nos pacientes soropositivos para o HIV submetidos à TARV, nos tempos 0, 60, 120 e 180 dias após o início dos tratamentos, nos grupos controle e suplementados.

Paciente	Grupo Controle N = 20 Tempo (dias)				Paciente	Grupo Ascorbato N = 13 Tempo (dias)				Paciente	Grupo $\alpha$ -tocoferol N = 14 Tempo (dias)			
	0	60	120	180		0	60	120	180		0	60	120	180
	<b>4</b>	19,76	4,93	4,7		4,71	<b>78</b>	6,70	6,74		5,2	1,50	<b>1</b>	8,79
<b>10</b>	16,79	7,70	13,3	5,32	<b>81</b>	9,06	10,46	58,3	-	<b>11</b>	6,85	0,92	1,6	3,09
<b>12</b>	6,23	5,58	4,0	2,04	<b>83</b>	2,95	3,32	3,1	2,44	<b>14</b>	1,99	-	-	4,06
<b>16</b>	9,86	16,76	12,8	14,03	<b>88</b>	4,19	2,81	1,1	0,57	<b>15</b>	5,78	5,26	9,3	6,89
<b>24</b>	8,11	2,04	9,2	9,11	<b>89</b>	5,17	1,10	1,0	0,76	<b>17</b>	4,00	1,97	2,5	3,24
<b>25</b>	7,29	4,48	14,2	2,07	<b>90</b>	4,82	2,82	2,0	0,31	<b>22</b>	4,07	9,23	8,4	6,40
<b>29</b>	1,36	4,91	-	2,87	<b>91</b>	1,12	0,18	1,7	0,97	<b>23</b>	1,89	3,72	2,6	3,97
<b>32</b>	16,95	12,53	8,1	10,85	<b>92</b>	2,30	3,12	0,7	0,78	<b>26</b>	4,89	4,71	6,6	5,83
<b>33</b>	1,36	4,30	-	2,09	<b>94</b>	2,03	1,76	2,0	0,89	<b>28</b>	7,09	2,55	3,6	3,98
<b>36</b>	2,74	0,42	5,9	4,97	<b>102</b>	3,42	2,49	1,2	1,19	<b>30</b>	4,59	1,70	2,6	3,91
<b>37</b>	25,81	24,98	21,1	21,91	<b>104</b>	3,78	0,55	0,5	0,78	<b>31</b>	3,50	6,47	3,6	1,44
<b>45</b>	8,53	16,03	34,7	2,72	<b>108</b>	3,47	0,69	0,4	0,78	<b>35</b>	7,19	4,93	5,8	20,47
<b>46</b>	6,37	5,83	24,8	4,75	<b>110</b>	2,89	1,33	1,2	0,76	<b>44</b>	11,17	1,30	1,8	1,19
<b>56</b>	13,95	11,43	22,6	14,21						<b>47</b>	2,07	2,90	3,6	3,37
<b>57</b>	24,25	1,27	4,9	1,99										
<b>77</b>	12,02	1,89	4,5	2,15										
<b>79</b>	0,76	1,32	0,4	0,45										
<b>80</b>	1,60	4,01	0,4	0,46										
<b>87</b>	2,26	1,46	1,3	0,95										
<b>120</b>	1,62	5,26	0,7	0,76										
<b>Média</b>	<b>9,38</b>	<b>6,86</b>	<b>10,42</b>	<b>5,42</b>	<b>Média</b>	<b>4,07</b>	<b>2,87</b>	<b>6,03</b>	<b>0,95</b>	<b>Média</b>	<b>5,28</b>	<b>3,81</b>	<b>4,32</b>	<b>5,12</b>
<b>DP</b>	<b>7,89</b>	<b>6,40</b>	<b>9,79</b>	<b>5,75</b>	<b>DP</b>	<b>2,13</b>	<b>2,84</b>	<b>15,75</b>	<b>0,57</b>	<b>DP</b>	<b>2,72</b>	<b>2,44</b>	<b>2,57</b>	<b>4,70</b>

N = número de pacientes

DP = Desvio Padrão

**Quadro 8.** Níveis séricos de IgA (mg/dl), nos pacientes soropositivos para o HIV submetidos à TARV, nos tempos 0, 60, 120 e 180 dias após o início dos tratamentos, nos grupos controle e suplementados.

Paciente	Grupo Controle N = 20 Tempo (dias)				Paciente	Grupo Ascorbato N = 13 Tempo (dias)				Paciente	Grupo $\alpha$ -tocoferol N = 14 Tempo (dias)			
	0	60	120	180		0	60	120	180		0	60	120	180
<b>4</b>	576	432	474	484	<b>78</b>	317	728	263	215	<b>1</b>	277	161	186	174
<b>10</b>	142	131	123	107	<b>81</b>	230	235	239	-	<b>11</b>	217	214	214	238
<b>12</b>	471	421	279	287	<b>83</b>	564	562	547	421	<b>14</b>	299	322	195	183
<b>16</b>	233	206	181	191	<b>88</b>	331	185	142	282	<b>15</b>	410	451	500	521
<b>24</b>	224	231	228	252	<b>89</b>	327	382	330	370	<b>17</b>	243	179	141	149
<b>25</b>	216	191	190	284	<b>90</b>	217	173	199	178	<b>22</b>	995	705	690	145
<b>29</b>	209	199	151	225	<b>91</b>	404	412	331	391	<b>23</b>	134	169	109	96
<b>32</b>	188	254	27	230	<b>92</b>	812	1.123	704	967	<b>26</b>	458	486	386	366
<b>33</b>	577	425	384	366	<b>94</b>	347	279	306	248	<b>28</b>	269	270	272	230
<b>36</b>	877	730	510	438	<b>102</b>	210	135	222	191	<b>30</b>	320	403	284	256
<b>37</b>	124	103	93	105	<b>104</b>	302	218	195	192	<b>31</b>	-	-	-	-
<b>45</b>	119	111	124	153	<b>108</b>	107	86	80	61	<b>35</b>	318	340	384	362
<b>46</b>	193	164	176	218	<b>110</b>	417	496	359	362	<b>44</b>	249	123	122	125
<b>56</b>	645	425	429	422						<b>47</b>	216	215	194	165
<b>57</b>	136	114	130	134										
<b>77</b>	265	247	179	174										
<b>79</b>	268	247	246	291										
<b>80</b>	212	653	474	476										
<b>87</b>	293	234	205	251										
<b>120</b>	254	207	202	187										
<b>Média</b>	<b>311,10</b>	<b>286,25</b>	<b>249,25</b>	<b>263,73</b>	<b>Média</b>	<b>352,69</b>	<b>385,69</b>	<b>301,31</b>	<b>314,81</b>	<b>Média</b>	<b>422,50</b>	<b>382,71</b>	<b>347,64</b>	<b>324,29</b>
<b>DP</b>	<b>206,34</b>	<b>174,97</b>	<b>130,83</b>	<b>117,93</b>	<b>DP</b>	<b>178,32</b>	<b>289,42</b>	<b>167,17</b>	<b>227,95</b>	<b>DP</b>	<b>374,54</b>	<b>313,38</b>	<b>291,42</b>	<b>256,34</b>

N = número de pacientes

DP = Desvio Padrão

**Quadro 9.** Níveis séricos de IgG (mg/dl), nos pacientes soropositivos para o HIV submetidos à TARV, nos tempos 0, 60, 120 e 180 dias após o início dos tratamentos, nos grupos controle e suplementados.

Paciente	Grupo Controle				Paciente	Grupo Ascorbato				Paciente	Grupo $\alpha$ -tocoferol			
	N = 20					N = 13					N = 14			
	Tempo (dias)					Tempo (dias)					Tempo (dias)			
	0	60	120	180		0	60	120	180		0	60	120	180
<b>4</b>	2.610	1.780	1.990	1.580	<b>78</b>	2.300	1.800	1.110	1.490	<b>1</b>	2.470	2.280	2.100	180
<b>10</b>	1.990	1.840	1.700	1.560	<b>81</b>	1.480	1.864	1.606	-	<b>11</b>	2.210	1.730	1.700	1.730
<b>12</b>	1.980	1.300	748	767	<b>83</b>	1.892	1.774	1.873	1.708	<b>14</b>	1.140	936	1.000	985
<b>16</b>	2.080	2.490	2.460	2.810	<b>88</b>	4.116	4.040	3.252	2.803	<b>15</b>	1.640	1.870	2.000	1.810
<b>24</b>	2.760	1.720	2.060	1.860	<b>89</b>	2.007	1.829	1.599	1.665	<b>17</b>	1.150	997	1.000	1.150
<b>25</b>	3.100	2.430	1.850	1.930	<b>90</b>	2.342	1.977	2.008	1.707	<b>22</b>	3.070	2.510	2.530	2.570
<b>29</b>	1.610	1.570	1.580	1.850	<b>91</b>	3.252	2.489	2.200	1.390	<b>23</b>	2.150	1.270	1.510	1.320
<b>32</b>	1.070	1.470	1.580	1.850	<b>92</b>	1.997	1.809	1.500	1.578	<b>26</b>	2.540	1.910	1.990	1.920
<b>33</b>	3.390	2.080	1.840	1.710	<b>94</b>	3.205	2.629	2.822	2.150	<b>28</b>	971	1.400	1.240	1.150
<b>36</b>	3.450	2.350	2.390	2.120	<b>102</b>	1.990	1.130	1.760	1.660	<b>30</b>	1.840	1.630	1.710	2.030
<b>37</b>	2.650	1.530	1.210	1.490	<b>104</b>	1.480	1.260	1.200	940	<b>31</b>	3.680	3.110	2.500	2.340
<b>45</b>	2.470	1.280	2.640	1.930	<b>108</b>	2.190	1.900	1.520	1.900	<b>35</b>	1.999	1.965	1.840	1.820
<b>46</b>	1.360	981	1.150	1.300	<b>110</b>	1.736	2.050	1.520	1.770	<b>44</b>	2.770	2.100	1.900	1.860
<b>56</b>	1.830	1.340	1.440	971						<b>47</b>	3.100	1.830	1.660	1.650
<b>57</b>	2.150	1.470	1.560	2.150										
<b>77</b>	2.324	2.190	1.380	1.999										
<b>79</b>	1.362	1.240	1.070	1.201										
<b>80</b>	671	2.320	1.242	1.820										
<b>87</b>	2.717	1.821	1.475	1.546										
<b>120</b>	1.794	1.460	1.580	1.540										
<b>Média</b>	<b>2168,40</b>	<b>1733,10</b>	<b>1573,75</b>	<b>1644,20</b>	<b>Média</b>	<b>2306,69</b>	<b>2042,38</b>	<b>1843,85</b>	<b>1730,08</b>	<b>Média</b>	<b>2195,00</b>	<b>1824,14</b>	<b>1762,86</b>	<b>1729,64</b>
<b>DP</b>	<b>746,58</b>	<b>445,52</b>	<b>466,28</b>	<b>442,18</b>	<b>DP</b>	<b>771,34</b>	<b>722,60</b>	<b>612,30</b>	<b>446,07</b>	<b>DP</b>	<b>808,28</b>	<b>584,65</b>	<b>472,04</b>	<b>452,35</b>

N = número de pacientes

DP = Desvio Padrão

**Quadro 10.** Níveis séricos de IgM (mg/dl), nos pacientes soropositivos para o HIV submetidos à TARV, nos tempos 0, 60, 120 e 180 dias após o início dos tratamentos, nos grupos controle e suplementados.

Paciente	Grupo Controle N = 20 Tempo (dias)				Paciente	Grupo Ascorbato N = 13 Tempo (dias)				Paciente	Grupo $\alpha$ -tocoferol N = 14 Tempo (dias)			
	0	60	120	180		0	60	120	180		0	60	120	180
<b>4</b>	218	141	160	141	<b>78</b>	186	132	86	76	<b>11</b>	296	251	147	115
<b>10</b>	281	254	228	193	<b>81</b>	102	91	65	-	<b>11</b>	90	40	42	50
<b>12</b>	170	141	39	69	<b>83</b>	152	143	122	58	<b>14</b>	101	249	134	133
<b>16</b>	146	120	114	100	<b>88</b>	242	185	295	110	<b>15</b>	108	83	107	85
<b>24</b>	298	173	174	223	<b>89</b>	160	118	109	114	<b>17</b>	227	161	141	158
<b>25</b>	158	126	101	116	<b>90</b>	108	36	52	41	<b>22</b>	345	194	189	216
<b>29</b>	121	134	145	125	<b>91</b>	305	123	106	74	<b>23</b>	350	282	197	176
<b>32</b>	65	73	63	84	<b>92</b>	88	127	61	85	<b>26</b>	183	118	123	118
<b>33</b>	165	93	86	71	<b>94</b>	366	205	202	177	<b>28</b>	80	87	68	68
<b>36</b>	298	118	113	107	<b>102</b>	203	103	121	128	<b>30</b>	134	115	121	243
<b>37</b>	113	43	40	52	<b>104</b>	150	100	86	85	<b>31</b>	282	157	99	154
<b>45</b>	200	102	105	151	<b>108</b>	110	95	73	63	<b>35</b>	228	193	266	189
<b>46</b>	122	87	50	120	<b>110</b>	109	112	108	98	<b>44</b>	125	71	386	125
<b>56</b>	163	77	58	73						<b>47</b>	158	101	93	93
<b>57</b>	269	173	213	350										
<b>77</b>	261	216	150	176										
<b>79</b>	165	189	183	129										
<b>80</b>	28	86	63	50										
<b>87</b>	212	91	131	78										
<b>120</b>	132	102	70	239										
<b>Média</b>	<b>179,25</b>	<b>126,89</b>	<b>114,28</b>	<b>132,35</b>	<b>Média</b>	<b>175,46</b>	<b>120,77</b>	<b>114,31</b>	<b>92,38</b>	<b>Média</b>	<b>193,36</b>	<b>150,12</b>	<b>150,90</b>	<b>137,38</b>
<b>DP</b>	<b>75,34</b>	<b>52,46</b>	<b>57,30</b>	<b>74,33</b>	<b>DP</b>	<b>84,71</b>	<b>42,28</b>	<b>66,49</b>	<b>36,50</b>	<b>DP</b>	<b>94,94</b>	<b>74,88</b>	<b>88,11</b>	<b>55,73</b>

N = número de pacientes

DP = Desvio Padrão

**Quadro 11.** Níveis séricos de  $\beta$ 2-Microglobulina (ng/dl), nos pacientes soropositivos para o HIV submetidos à TARV, nos tempos 0, 60, 120 e 180 dias após o início dos tratamentos, nos grupos controle e suplementados.

Paciente	Grupo Controle N = 20 Tempo (dias)				Paciente	Grupo Ascorbato N = 13 Tempo (dias)				Paciente	Grupo $\alpha$ -tocoferol N = 14 Tempo (dias)			
	0	60	120	180		0	60	120	180		0	60	120	180
	<b>4</b>	3.001	2.161	2.427		1.968	<b>78</b>	4.406	1.965		2.917	1.397	<b>11</b>	5.027
<b>10</b>	4.028	3.070	2.300	2.542	<b>81</b>	1.597	2.277	2.269	-	<b>11</b>	4.182	2.542	3.030	2.930
<b>12</b>	3.243	2.583	2.132	2.249	<b>83</b>	604	1.600	1.644	1.860	<b>14</b>	2.031	1.480	1.607	2.000
<b>16</b>	3.034	2.444	2.530	1.132	<b>88</b>	2.884	1.743	1.384	1.084	<b>15</b>	2.915	2.550	2.575	1.982
<b>24</b>	2.796	2.579	2.378	2.608	<b>89</b>	2.454	2.081	1.144	1.892	<b>17</b>	2.569	1.476	2.345	2.193
<b>25</b>	2.776	2.579	2.378	2.197	<b>90</b>	3.087	2.162	1.751	1.356	<b>22</b>	6.232	3.637	4.346	6.396
<b>29</b>	3.505	2.657	2.620	3.018	<b>91</b>	2.697	2.144	7.960	964	<b>23</b>	1.976	1.177	1.656	1.881
<b>32</b>	2.930	2.452	2.611	2.035	<b>92</b>	3.021	1.668	1.360	2.400	<b>26</b>	2.763	2.984	3.500	3.624
<b>33</b>	2.493	1.787	1.727	1.722	<b>94</b>	1.717	1.584	1.560	2.324	<b>28</b>	3.936	2.542	2.333	3.247
<b>36</b>	2.915	2.460	2.390	2.307	<b>102</b>	3.840	1.004	1.771	1.100	<b>30</b>	4.428	3.325	3.469	3.200
<b>37</b>	2.201	1.984	1.935	2.073	<b>104</b>	3.652	2.176	1.748	1.288	<b>31</b>	3.149	2.825	2.533	2.796
<b>45</b>	3.202	2.985	2.271	1.980	<b>108</b>	1.740	1.812	1.292	1.056	<b>35</b>	2.107	1.730	2.040	1.609
<b>46</b>	1.911	2.130	2.267	1.431	<b>110</b>	1.604	1.912	1.916	2.100	<b>44</b>	2.804	2.964	2.742	2.622
<b>56</b>	2.837	2.178	2.579	2.124						<b>47</b>	2.776	1.722	2.070	2.316
<b>57</b>	1.796	1.341	1.308	1.225										
<b>77</b>	3.976	2.162	4.438	2.224										
<b>79</b>	2.943	2.007	3.790	1.540										
<b>80</b>	5.393	3.036	4.463	1.925										
<b>87</b>	3.650	2.257	1.602	1.485										
<b>120</b>	2.368	3.268	2.076	2.380										
<b>Média</b>	<b>4049,90</b>	<b>2406,00</b>	<b>2642,65</b>	<b>2108,25</b>	<b>Média</b>	<b>2715,62</b>	<b>1856,00</b>	<b>2208,92</b>	<b>1568,42</b>	<b>Média</b>	<b>3349,64</b>	<b>2457,86</b>	<b>2714,71</b>	<b>2895,71</b>
<b>DP</b>	<b>4589,76</b>	<b>470,24</b>	<b>1075,07</b>	<b>494,39</b>	<b>DP</b>	<b>902,56</b>	<b>346,09</b>	<b>1788,76</b>	<b>519,60</b>	<b>DP</b>	<b>1249,63</b>	<b>806,76</b>	<b>812,04</b>	<b>1210,07</b>

N = número de pacientes

DP = Desvio Padrão

## **ANEXOS**

**ANEXO 1. Termo de Consentimento**

## TERMO DE CONSENTIMENTO

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

Florianópolis, ...../...../.....

Nome completo: .....  
 RG: ..... CPF: .....  
 Rua: ..... Cidade: .....  
 Bairro: ..... CEP: .....  
 Telefone para contato: .....

---

Assinatura

**ANEXO 2. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos**