

Cadiele Oliana Reichert

**A INFLUÊNCIA DA HEPCIDINA EM ASPECTOS DO  
METABOLISMO DO FERRO DE INDIVÍDUOS PORTADORES  
DO VÍRUS HIV-1**

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

Orientador: Prof. Dr. Celso Spada

Florianópolis  
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Reichert, Cadiele Oliana

A influência da hepcidina em aspectos do metabolismo do ferro de indivíduos portadores do vírus HIV-1 / Cadiele Oliana Reichert ; orientador, Celso Spada, 2018.

106 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Hecpidina. 3. gene HAMP. 4. HIV  
1. 5. Ferro. I. Spada, Celso. II. Universidade  
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação  
em Farmácia. III. Título.

**“A influência da Hepeidina em aspectos do metabolismo do Ferro de indivíduos portadores do vírus HIV-1”**

**POR**

**Cadiele Oliana Reichert**

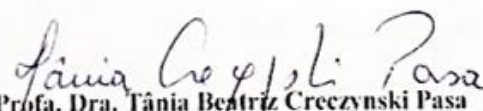
Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelo(a) Orientador(a) e membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:

**Banca Examinadora:**

  
\_\_\_\_\_  
Prof(a). Dr(a). Karim-Silva Caumo (UFSC – Membro Titular)

  
\_\_\_\_\_  
Prof(a). Dr(a). Sérgio Paulo Bydlowski (USP – Membro Titular)

  
\_\_\_\_\_  
Prof(a). Dr(a). Celso Spada (UFSC – Orientador(a))

  
Prof(a). Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da  
UFSC  
Florianópolis, 28 de fevereiro de 2018.



*No profundo azul claro dos teus olhos,  
Descobri,  
O mais belo, mais puro e sincero dos  
sentimentos,  
Não era amor, era muito mais do que  
amor!  
Era tão grande, tão intenso e glorioso  
que neste mundo não coube.  
Deus levou para si.  
A ti, minha vida.*

Dedico este trabalho a minha mãe,  
Margarida (*in memoriam*).



## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida a mim concebida.

À minha mãe, Margarida, por ser exemplo repleto de coragem, amor e sabedoria.

À minha irmã, Patrícia, por sempre me apoiar e incentivar.

Ao meu orientador, Dr. Celso Spada, por todos os momentos de aprendizado, orientações, muitas “desorientações” e toda minha evolução profissional e pessoal. Obrigada pela oportunidade!

Aos integrantes e colaboradores do LIM31, em especial ao professor Sérgio Paulo Bydlowski, por ter aceito a realização dos experimentos em seu laboratório.

À Dr.<sup>a</sup> Débora Levy, pelo seu auxílio, durante todas as etapas da execução deste trabalho.

Ao Laboratório Didático de Hematologia Clínica da Universidade Federal de Santa Catarina, por todos os momentos de aprendizado e convivência desde a época da graduação até a conclusão do mestrado.

À professora Dr.<sup>a</sup> Ana Carolina de Moraes, por todo o aprendizado e auxílio nas análises estatísticas deste trabalho.

Aos alunos do curso de Farmácia-UFSC, da disciplina de Hematologia Clínica, em que fiz o estágio em docência, por todo o aprendizado e risadas, ambiente e local onde percebi que estou no caminho que escolhi.

Aos pacientes, que gentilmente doaram amostras biológicas para a execução deste trabalho, sem eles, nada seria possível.

Aos meus amigos e irmãos de coração, que tanto amo, por sempre estarem ao meu lado, em todos os momentos, um agradecimento especial a Débora, Andresa, Flávio, Jhonathan e Edson.

Às minhas colegas de pensão, por todo o exercício de paciência, risadas, brigas e aprendizado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina, por todo o conhecimento pessoal e profissional que adquiri durante este período.

À CAPES, pela concessão da bolsa.

À Universidade Federal de Santa Catarina, por todas as coisas que aprendi, por todo o acolhimento, conhecimento e crescimento que obtive aqui, neste lugar, desde 2009 até presente data.

A todas as pessoas que passaram pela minha vida, de uma forma ou de outra, e que contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.





*“Se enxerguei mais longe, foi porque me apoiei sobre os ombros de gigantes.”*  
*(Isaac Newton)*



## RESUMO

A hepcidina—codificada pelo gene *HAMP*—atua no controle da absorção, circulação e armazenamento de ferro no organismo. Estudos sugerem que os estoques de ferro celular influenciam no curso e progressão da infecção pelo vírus HIV-1. Portanto, foi avaliado, a influência da hepcidina no metabolismo do ferro em 199 indivíduos portadores do vírus HIV-1; bem como, verificou-se a frequência das variantes, c.251A>G e c.212G>A do gene *HAMP* em 191 indivíduos HIV-1 e 100 indivíduos soronegativos para HIV-1, através da técnica de PCR em tempo real. A concentração de hepcidina foi determinada por ELISA. O valor de referência estabelecido para hepcidina foi correlacionado com biomarcadores do metabolismo do ferro, com o hemograma, leucograma e marcadores de infecção pelo HIV-1. A mediana da concentração de hepcidina em indivíduos saudáveis foi de 235,5 µg/L e o intervalo de referência estabelecido entre 114—477 µg/L. As concentrações séricas de hepcidina foram semelhantes entre o grupo de indivíduos soronegativo 235,5(114—477) µg/L e grupo ART-naive 274(128—409) µg/L, enquanto que nos grupos fazendo uso da TARV a concentração foi elevada, INNTR/INTR com 444 (124—580) µg/L e INTR/IP com 412(185—548) µg/L. No grupo ART-naive a concentração de hepcidina teve uma correlação com a concentração de ferro ( $r=0,278$ ;  $p<0,05$ ), com a carga viral ( $r=0,259$ ;  $p<0,05$ ) e com o número de LT-CD4+ ( $r=0,280$ ;  $p<0,05$ ). Nos grupos INNTR/INTR a concentração de hepcidina correlacionou-se negativamente com o número de neutrófilos segmentados ( $r=-0,379$ ;  $p<0,05$ ) e com o número de monócitos ( $r=-0,443$ ;  $p<0,05$ ). Cerca de 18,6% (37) dos indivíduos portadores do vírus HIV-1 apresentaram anemia ferropênica. A menor concentração de ferro foi encontrada no grupo ART-naive ( $75\pm 27$  µg/dL), quando comparado aos demais grupos INNTR/INTR=  $82\pm 35$  µg/dL e INTR/IP=  $88\pm 40$  µg/dL ( $p<0,05$ ). A frequência do alelo AG da variante c.251A>G foi de 47,7% em indivíduos portadores do vírus HIV-1 quando comparado aos indivíduos soronegativos para HIV-1, foi de 39,0%. O genótipo AG foi relacionado ao aumento da concentração sérica de hepcidina, tanto em indivíduos soronegativos quanto em indivíduos portadores do vírus HIV-1. De acordo com os resultados obtidos, a concentração sérica de hepcidina influencia no metabolismo do ferro de indivíduos HIV-1 e contribui para o desenvolvimento de alterações hematológicas.

**Palavras-chave:** AIDS, ferro, gene *HAMP*, hepcidina, HIV-1, inflamação.



## ABSTRACT

The hepcidin protein, synthesized in the liver and encoded by the *HAMP* gene, acts to control the absorption, circulation and storage of iron in the body. Different studies have suggested that cellular iron stores influence the course and progression of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) infection. In this context, the influence of hepcidin on iron metabolism in 199 HIV-1 virus carriers was evaluated; as well as the frequency of variants, c.251A> G and c.212G> A, of the *HAMP* gene in 191 HIV-1 individuals and 100 HIV-1 seronegative individuals were verified by real polymerase chain reaction. Serum hepcidin concentration was determined by enzyme immunoassay. A reference value for hepcidin was established in order to correlate the serum concentration of hepcidin with biomarkers of iron metabolism, with the blood count, leukogram and markers of HIV-1 infection. The median serum hepcidin concentration in healthy subjects was 235.5 µg /L and the reference range established was between 114-477 µg/L. Serum hepcidin concentrations were similar between the 235.5 (114-477) µg/L seronegative group and the ART-naive 274 (128-409) µg/L group, whereas in the groups taking antiretroviral therapy the concentration was elevated, NNRTI/INTR with 444 (124-580) µg/L and INTR/IP with 412 (185-548) µg/L. In the ART-naive group, the serum concentration of hepcidin had a correlation with iron concentration ( $r = 0.278$ ,  $p < 0,05$ ), viral load ( $r = 0.259$ ,  $p < 0,05$ ) and CD4+ ( $r = 0.280$ ,  $p < 0,05$ ). In the NNRTI / NRTI groups, serum hepcidin concentration was negatively correlated with the number of segmented neutrophils ( $r = -0.379$ ,  $p < 0,05$ ) and monocyte numbers ( $r = -0.443$ ,  $p < 0,05$ ). About 18.6% (37) individuals with HIV-1 virus had iron deficiency anemia. The lowest iron concentration was found in the ART-naive group ( $75 \pm 27$  µg / dL), when compared to the other NNRTI / INTR groups =  $82 \pm 35$  µg / dL and INTR / IP =  $88 \pm 40$  µg / dL) 0,05). The frequency of the AG allele of the c.251A> G variant was 47.7% in HIV-1 virus-infected individuals compared to HIV-1 seronegative individuals, which was 39.0%. The AG genotype was related to increased serum hepcidin concentration, both in seronegative individuals and in HIV-1 virus carriers. According to the results, the serum concentration of hepcidin influences the iron metabolism of HIV-1 individuals and contributes to the development of hematological alterations

**Keywords:** AIDS, iron, *HAMP* gene, hepcidin, HIV-1, inflammation.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do vírus HIV-1 .....	31
Figura 2. A utilização do ferro para a replicação do vírus HIV-1 .....	34
Figura 3. Metabolismo do ferro regulado pela hepcidina.....	40
Figura 4. Regulação do gene <i>HAMP</i> através de estímulos inflamatórios e concentração de ferro.....	43
Figura 5. Ilustração do gene <i>HAMP</i> e suas regiões polimórficas .....	46
Figura 6. Desenho do estudo realizado .....	50
Figura 7. Intervalo dos valores de referência de hepcidina nos grupos estudados .....	68





## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições de amplificação e genotipagem dos polimorfismos .....	54
Tabela 2. Comparação dos marcadores de infecção dos grupos avaliados (n=299) .....	58
Tabela 3. Comparação dos parâmetros hematológicos dos grupos HIV-1 (n=199) .....	60
Tabela 4. Comparação do leucograma entre os grupos estudados .....	62
Tabela 5. Comparação entre os marcadores de ferro dos grupos HIV-1 .....	64
Tabela 6. Dosagens dos marcadores inflamatórios .....	65
Tabela 7. Concentração de hepcidina nos indivíduos saudáveis .....	67
Tabela 8. Concentração de hepcidina nos grupos estudados .....	67
Tabela 9. Distribuição dos genótipos entre indivíduos portadores de HIV-1 e indivíduos soronegativos (n=291) .....	71
Tabela 10. Distribuição dos genótipos entre soronegativos, ART-naive, INNTR/INTR e INTR/IP (n=291) .....	71
Tabela 11. Concentração sérica de hepcidina divididos em baixo, médio e superior de acordo com o intervalo de referência estabelecido .....	72
Tabela 12. Frequência das concentrações de hepcidina de acordo com os alelos .....	73
Tabela 13. Indivíduos anêmicos .....	75



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[Tf-Fe<sup>3+</sup>] – Complexo de transferrina-ferro  
ADC – Anemia de doença crônica  
AI – Anemia de inflamação  
Aids – *Acquired immunodeficiency syndrome*  
ART-naïve – Terapia antirretroviral-*naive*  
AZT – Zidovudina  
BMP – *Bone morphogenetic proteinase*  
BS-HU/UFSC – Banco de Sangue do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina  
CCR5 – *Chemokine (C-C motif) receptor type 5*  
cDNA – DNA complementar  
CEPSH-HU UFSC – Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina  
CHCM – Concentração de hemoglobina corpuscular média  
CMN – Células mononucleares  
CMN-SP – Células mononucleares do sangue periférico  
CTFL – Capacidade total de ligação ao ferro  
CV – Carga viral  
CXCR4 – *C-X-C chemokine receptor type 4*  
dCytB – Enzima citocromo b duodenal  
DMT-1 – Transportador de metal divalente tipo-1  
dNTPs – Desoxirribonucleotídeos fosfatados  
DOHH – *Deoxyhypusine-hydroxylase*  
EDTA – *Ethylenediamine tetraacetic acid*  
*eIF5a* – *Eukaryotic initiation factor 5A*  
ELISA – Ensaio imunoenzimático (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)  
EROs – Espécies reativas de oxigênio  
EUA – Estados Unidos da América  
Fe<sup>+2</sup> – Ferro ferroso  
Fe<sup>+3</sup> – Ferro férrico  
Fpn – Ferroportina  
GDF-15 – *Growth differentiation factor 15*  
gp41 – Glicoproteína 41  
gp120 – Glicoproteínas 120  
gp130 – Glicoproteína 130  
HAART – *Highly Active Antiretroviral Therapy*  
Hb – Hemoglobina

HBV – Vírus da hepatite  
HCM – Hemoglobina corpuscular média  
HCP-1 – Proteína transportadora de heme-1  
HCV – Vírus da hepatite C  
HIV – *Human Immunodeficiency Virus*  
HJV – *Hemojuvelina*  
HO – Heme oxigenase  
hs-CRP – Proteína C reativa ultrasensível  
HTLV-III – *Human T-lymphotropic virus III*  
HY – Aminoácido hipusina  
ICTV – *International Committee on Taxonomy of Viruses*  
IFI – Imunofluorescência indireta  
IKK – *IκB kinase*  
IL-1β – Interleucina- 1β  
IL-15 – Interleucina-15  
IL-6 – Interleucina- 6  
IL-6-R – Interleucina-6 receptor  
IMC – Índice de massa corpórea  
INTR/INNTR – Inibidores nucleosídeos da transcriptase reversa/inibidores não nucleosídeos da transcriptase reversa  
INTR/IP – Inibidores nucleosídeos da transcriptase reversa/inibidor de protease).  
IRIDA – *Iron-refractory iron deficiency anemia*  
JAK – *Janus kinase*  
Kb – Kilobase  
LEAP-1 – *Liver-Expressed Antimicrobial Peptide*  
LT-CD4+ – linfócitos T-CD4+  
LT-CD8+- – linfócitos T-CD8+  
LTR – *Long terminal repea*  
LVA – *Lymphadenopathy associated virus*  
mRNA – Messenger *ribonucleic acid*  
NASBA – *Nucleic Acid Sequence-Based Amplification*  
NaCl – Cloreto de sódio  
NF- κB – fator nuclear *kappa B*  
p6 – proteína 6  
p7 – proteína 7  
p17 – proteína 17  
p24 – proteína 24  
PCR – Reação em cadeia da polimerase e Proteína C reativa  
RDW – Distribuição dos eritrócitos  
R-SMAD – Receptor regulador de SMAD

SIDA – Síndrome da imunodeficiência adquirida  
SMAD – *Small mother against decapentaplegic*  
SNP – *Single nucleotide polymorphisms*  
SRA – Síndrome Retroviral Aguda  
ssRNA – RNA senso positivo  
ST – Saturação de transferrina  
STAT – *Signal Transducer and Activator of Transcription*  
SUS – Sistema Único de Saúde  
TAR – *Transactivation responsive region*  
TARV – Terapia antirretroviral  
TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido  
TE – Tris/EDTA/NaCl  
TfR – *Receptor de transferrina*  
TIBC – *Total iron binding capacity*  
TMPRSS6 – Proteína matriptase-2  
TR – Transcriptase reversa  
VCM – Volume corpuscular médio  
VPM – Volume plaquetar médio



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>25</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA DA PROPOSTA</b> .....	<b>28</b>
2.1 HIPÓTESE .....	28
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>29</b>
3.1 INFECÇÃO PELO VÍRUS HIV, SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA (AIDS).....	29
<b>3.1.1 Replicação do HIV e ferro</b> .....	<b>31</b>
<b>3.1.2 HIV-1 e inflamação</b> .....	<b>35</b>
<b>3.1.3 Alterações hematológicas em indivíduos portadores de HIV-1</b> .....	<b>35</b>
<b>3.1.4 Anemia em indivíduos HIV-1</b> .....	<b>36</b>
3.2 PEPTÍDEO HEPCIDINA .....	38
<b>3.2.1 Metabolismo do ferro: renovação e equilíbrio</b> .....	<b>38</b>
<b>3.2.2 Ferroportina: receptor de hepcidina</b> .....	<b>41</b>
3.3 REGULAÇÃO GÊNICA DA HEPCIDINA .....	42
3.4 HEPCIDINA, FERRO E HIV-1 .....	46
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	<b>48</b>
4.1 OBJETIVO GERAL .....	48
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	48
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>49</b>
5.1 ASPECTOS LEGAIS DA BIOÉTICA .....	49
5.2 CASUÍSTICA .....	49
5.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	51
5.4 COLETA E FRACIONAMENTO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	51
5.5 QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL (RNA) DO HIV- 1 .....	51
5.6 QUANTIFICAÇÃO DOS LINFÓCITOS T-CD4+ E T- CD8+ .....	52
5.7 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS .....	52
5.8 DETERMINAÇÃO DOS MARCADORES DE FERRO. 52	

5.9 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA C REATIVA E DE IL-6 .....	53
5.10 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE HEPCIDINA.....	53
5.11 EXTRAÇÃO DE DNA DE CMN-SP .....	53
5.12 GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS C.251A>G E C.212G>A DO GENE <i>HAMP</i> .....	54
5.13 ANÁLISE DE DADOS .....	54
<b>6.0 RESULTADOS .....</b>	<b>56</b>
6.1 DESCRIÇÃO DAS AMOSTRA .....	56
6.2 MARCADORES DE INFECÇÃO DO HIV-1 .....	56
6.3 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS .....	59
<b>6.3.1 Leucograma .....</b>	<b>61</b>
6.4 MARCADORES DO METABOLISMO DO FERRO.....	63
6.5 QUANTIFICAÇÃO DE INTERLEUCINA-6 E PROTEÍNA C REATIVA .....	65
6.6 QUANTIFICAÇÃO SÉRICA DE HEPCIDINA .....	66
<b>6.6.1 Correlação entre hepcidina e os parâmetros analisados .....</b>	<b>69</b>
6.7 GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS .....	70
<b>6.7.1 Correlação entre o polimorfismo c.251A&gt;G e concentração sérica de hepcidina .....</b>	<b>72</b>
6.8 INVESTIGAÇÃO DE ANEMIA .....	74
<b>7.0 DISCUSSÃO .....</b>	<b>77</b>
<b>8. CONCLUSÃO.....</b>	<b>84</b>
<b>9.0 PERSPECTIVAS.....</b> Erro! Indicador não definido.	
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>87</b>
<b>APÊNDICE A - Correlação entre hepcidina e os parâmetros analisados no estudo .....</b>	<b>104</b>



## 1. INTRODUÇÃO

As desordens relacionadas ao metabolismo do ferro envolvem alterações genéticas e fisiológicas entre hepcidina e a via de modulação do gene *HAMP* com prejuízos ao organismo, podendo ocorrer sobrecarga ou deficiência de ferro (KRAUSE et al., 2000; PARK et al., 2001; NEMETH et al., 2004; 2014). O excesso intracelular de ferro e a hiperferremia, contribuem para a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), através da reação de Fenton, danificando as membranas celulares e os tecidos, principalmente o tecido cardíaco, o endócrino e o hepático (KAISER et al., 2009).

O ferro acumulado favorece a patogênese e desenvolvimento de doenças que causam imunossupressão, tendo como exemplo a infecção pelo vírus HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) e os agravos relacionados a doença de Aids (*Acquired immunodeficiency syndrome*), por microrganismos oportunistas e modificações no metabolismo do indivíduo (DRAKESMITH et al., 2012).

Conquanto, a acentuada síntese de hepcidina, diminui a formação de hemoglobina (Hb), limitando a formação de precursores eritróides, com redução dos estoques de ferro, e posterior progresso de um quadro anêmico. Indivíduos infectados pelo vírus HIV, no decorrer da doença, desenvolvem anemia de doença crônica (ADC) ou anemia de inflamação (AI), com alterações hematológicas, decorrentes do tratamento utilizado e/ou através da ação do vírus nos progenitores eritróides e na medula óssea. Tais alterações manifestam-se, com um quadro clínico de leucopenia, trombocitopenia e diminuição na produção de eritrócitos (FLEMING et al., 2008; DE FALCO et al., 2013).

O ferro é necessário para a produção de células e manutenção da vida, porém o organismo humano não apresenta meios de controle da absorção e eliminação de ferro. Sendo atribuído à hepcidina, a função de reguladora do metabolismo do ferro, por atuar no duodeno, através do bloqueio dos estoques de ferro, inibindo a movimentação de ferro através da ferroportina (Fpn) (GANZ, 2011). Dessa forma, as reservas de ferro sistêmico, a concentração elevada de transferrina no plasma, a atividade eritropoiética, mediadores inflamatórios e hipóxia modulam a síntese de hepcidina (PIPERNO et al., 2011).

A concentração de ferro plasmático é o principal indutor do gene *HAMP* para a transcrição de mRNA (*messenger ribonucleic acid*) de hepcidina no tecido hepático (RAMOS et al., 2011; PAK et al., 2006; KÜHN et al., 2015; GULEC et al., 2017). Estudos tem demonstrado que

alterações nesse gene, interferem diretamente no metabolismo do ferro, por alterar as concentrações séricas de hepcidina (GANZ, 2011; PIETRANGELO et al., 2015; GOZZELINO et al., 2016).

As células mononucleares (CMN) são os principais reservatórios de ferro no sangue periférico e esses estoques de ferro são modulados pela concentração sérica de hepcidina. Essas células, estão expostas à infecção pelo HIV-1 por apresentarem co-receptores CCR5 (*Chemokine (C-C motif) receptor type 5*) e CXCR4 (*C-X-C chemokine receptor type 4*). Após a fusão do capsídeo viral do HIV-1 e integração do genoma viral, começa o processo de replicação do vírus, o qual requer ferro em várias etapas da formação do vírion até as partículas virais maduras (DRAKESMITH et al., 2008; NEKHAI et al., 2013; SHANKARAN et al., 2017).

O aumento de hepcidina sérica, em conjunto com concentrações elevadas de ferritina, contribuem para a replicação do vírus HIV-1 e favorecem as coinfeções, como tuberculose, infecções pelo vírus da hepatite B e C, por protozoários, fungos e no desenvolvimento de neoplasias (MINCHELLA et al., 2014; AHMED et al., 2016; CUSTER et al., 2018).

O estado inflamatório decorrente da Aids no organismo, induz a transcrição de hepcidina. Existem controvérsias sobre o papel da hepcidina no metabolismo do ferro em indivíduos HIV-1, uma vez que, quando descrita no ano de 2000, a hepcidina era classificada como proteína de fase aguda, fazendo parte da imunidade inata, como uma  $\beta$ -defensina. Brevemente, as defensinas são pequenos peptídeos catiônicos, com atividade contra bactérias, fungos e vírus envelopados, como o HIV-1 (WILSON et al., 2013; HOLLY et al., 2017). Todavia, alguns autores sugerem que a hepcidina auxilia na replicação viral, por alterar o metabolismo do ferro, e mantendo os estoques de ferritina aprisionados em células que o vírus HIV-1 infecta. Essa retenção de ferro celular favorece a replicação acentuada do vírus durante a infecção aguda e, na infecção crônica, mantém o vírus no estado de latência (XU et al., 2010; KUMARI; HUANG et al., 2016; KUMAR et al., 2014).

Até a presente data é correto afirmar que a hepcidina regula o metabolismo do ferro e que em situações de estresse e inflamação, encontra-se elevada, bem como faz parte da imunidade inata, sendo que uma situação pode ser decorrente da outra. E neste caso, contribuir para replicação do vírus HIV-1. Este trabalho visa relacionar o eixo hepcidina-ferro em indivíduos portadores do vírus HIV-1, a fim de compreender a relação entre HIV-1 e hepcidina e estabelecer um valor de referência para

a concentração sérica de hepcidina, uma vez que não há um valor de referência universal, devido as variações entre indivíduos e etnias.

## 2. JUSTIFICATIVA DA PROPOSTA

A moderna terapia antirretroviral, HAART, permite uma maior sobrevida e uma melhor qualidade de vida aos indivíduos portadores de HIV-1, ao controlar efetivamente a replicação viral, diminuindo consideravelmente o estado de imunossupressão. O grande desafio é buscar alternativas que propiciem uma remissão completa da replicação viral, ou ainda, seu controle de maneira menos prejudicial ao indivíduo soropositivo, uma vez que o uso da terapia antirretroviral traz alterações danosas ao organismo.

A relação entre o *status* de ferro e a infecção pelo HIV-1 é complexa. Distúrbios do metabolismo de ferro têm sido associados como preditores de progressão de morbimortalidade em portadores do vírus HIV-1 e com a doença de Aids. A hipótese mais aceita é de que elevadas concentrações de ferro em células da medula óssea, cérebro, fígado e macrófagos associam-se a um aumento da transcrição do vírus HIV-1, contribuindo com a progressão da doença, com a deficiência do sistema imune, com o aumento de infecções oportunistas e do índice de mortalidade.

A regulação fisiológica das concentrações de ferritina intracelular em células mononucleares do sangue periférico (CMN-SP) envolve a ligação da hepcidina à ferroportina. Com isso, a expressão e/ou concentração de hepcidina circulante pode afetar a replicação viral do HIV-1 ao controlar a disponibilidade de ferro intracelular, elemento indispensável para a transcrição do HIV-1, uma vez que os processos de replicação viral ocorrem nessas células. Nesse contexto, a melhor compreensão do mecanismo de controle de ferro pela hepcidina em CMN-SP e sua capacidade de afetar a replicação viral do HIV-1, pode ser uma nova alternativa para o controle da replicação do HIV-1 e para o desenvolvimento de alterações hematológicas relacionadas a infecção pelo HIV-1 e ao desenvolvimento da doença de Aids, bem como, pela utilização da TARV.

### 2.1 HIPÓTESE

A concentração elevada de hepcidina em indivíduos portadores do vírus HIV-1, auxilia na replicação viral do HIV-1, através da modificação de biomarcadores do metabolismo do ferro, contribuindo para o surgimento das alterações hematológicas.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 INFECÇÃO PELO VÍRUS HIV, SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA (AIDS)

O surgimento de inúmeros indivíduos identificados com sarcoma de Kaposi e pneumonia por *Pneumocystis jiroveci* (antes referido como *Pneumocystis carinii*) — doenças relacionadas a imunodeficiência — em meados de 1981 nos Estados Unidos da América (EUA), com etiologia transmissível, infecciosa e desconhecida, foi caracterizada como síndrome da imunodeficiência adquirida (CDC,1982).

Nos anos seguintes, em 1983, foi descrito o vírus HIV-1, sendo inicialmente denominado HTLV-III (*Human T-lymphotropic vírus*) nos EUA e LVA (*lymphadenopathy associated vírus*) na França, e em 1986, foi descrito o HIV-2. Desde então, foi padronizado pelo Comitê Internacional de Taxonomia de vírus (ICTV- *International Committee on Taxonomy of Viruses*) como vírus da imunodeficiência humana (GONG,1984).

Desde o seu surgimento nos EUA até os dias atuais, a infecção pelo HIV acomete cerca de 36,7 milhões de pessoas no mundo, sendo que a cada ano aproximadamente 1,8 milhões de novas infecções são diagnosticadas. Deste total cerca de 53% dos indivíduos portadores de HIV tem acesso a terapia antirretroviral (TARV). No Brasil, cerca de 830.000 pessoas vivem com HIV, deste total, 64% dos indivíduos recebem a TARV do Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2017).

No Brasil, a TARV é oferecida a qualquer indivíduo portador do vírus, independente do seu estado imunológico, desde 2013. Esta medida foi adotada para conter o aumento de novas infecções no país. Mesmo assim, a epidemia proporcionada pelo HIV continua crescendo, principalmente entre jovens, na faixa etária entre 14 e 24 anos de idade, com aproximadamente 48.000 novas infecções sendo notificadas anualmente (UNAIDS, 2017).

Embora órgãos governamentais e não governamentais façam campanhas a fim de diminuir as taxas de infecções pelo vírus HIV, a epidemia é crescente e dá-se, principalmente, em decorrência da forma de infecção, com ênfase, a sexual, podendo ocorrer através de secreções vaginais, sêmen, sangue, transmissão vertical e leite materno. A natureza biológica e genética do vírus contribui positivamente para a infecção e o desenvolvimento da doença de Aids (BRASIL, 2017; BUTLER et al., 2007).

O HIV pertencente à família *Retroviridae*, e faz parte do grupo dos lentivírus citoplasmáticos não oncogênicos. Os retrovírus são vírus que têm seu material genético constituído de RNA e apresentam a enzima transcriptase reversa (TR), que é capaz de transformar o RNA viral em cDNA (DNA complementar). Este cDNA é inserido pela enzima integrase ao DNA da célula infectada do hospedeiro para começar o ciclo viral (BARBER et al., 1990).

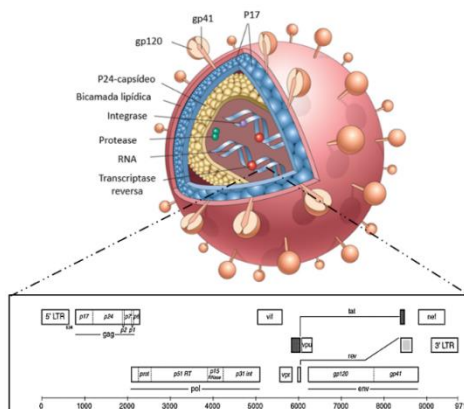
A estrutura do vírus, (Figura 1), compõe uma camada externa, o envelope, composto por lipídeos e as glicoproteínas 120 (gp120) e 41 (gp41). A gp120 é a mais externa, e responsável pela ligação do vírus com as células hospedeiras, estando ligada a proteína transmembranar gp41. Internamente, encontra-se a proteína 17 (p17). A estrutura interna do HIV é o cerne ou capsídeo viral, constituído pela proteína p24, que envolve o material genético viral, composto por duas fitas de RNA senso positivo (ssRNA), as enzimas transcriptase reversa, integrase e protease (FRANKEL et al., 1998).

A base genética do vírus engloba, três genes importantes. O gene *gag*, que codifica as proteínas do core viral, a p17, p24, p6 e p7. O gene *pol*, que transcreve as enzimas protease, integrase e transcriptase reversa. E o gene *env*, que codifica as proteínas do envelope, a gp120 e a gp41. O HIV-1 apresenta genes adicionais que codificam as proteínas reguladoras *Tat*, *Ver*, *Vif*, *Vpr*, *Vpu* e *Nef* (VAN LINT et al., 2013).

Após a internalização do vírus, a infecção pelo HIV-1 é dividida em fase aguda e fase avançada. Em indivíduos não tratados, estima-se que o tempo médio entre contágio, a infecção e o aparecimento da doença esteja em torno de dez anos. A infecção aguda compreende as primeiras semanas da infecção pelo HIV, até o aparecimento de anticorpos anti-HIV, a soroconversão, pode demorar de 4 a 8 semanas, formando diariamente cerca de  $10^7$  partículas virais (MIRÓ et al., 2011).

As manifestações clínicas são denominadas de Síndrome Retroviral Aguda (SRA), e incluem febre, adenopatia, faringite, exantema, mialgia, cefaleia, náuseas, vômitos, diarreia, perda de peso, úlceras orais, dentre outros. Nesse estágio, a contagem de linfócitos T-CD4+ (LT-CD4+) decresce de 1000 para 500 células/mm<sup>3</sup> aproximadamente, a sorologia é negativa, e o diagnóstico pode ser realizado através da detecção do RNA do HIV através de técnicas de biologia molecular (MACNEAL et al., 2006; BRASIL, 2017).

**Figura 1. Estrutura do vírus HIV-1**



Na figura esta demonstrado a imagem gráfica do vírus HIV-1 com os seus elementos constitucionais. As proteínas que formam capsídeo, p24 e a p17 que forma a matriz viral. Externamente, encontra-se as glicoproteínas gp120 e gp41, essenciais para a ligação do vírus as células LT-CD4+. No interior do vírus, encontra-se o material genético viral, composto por duas fitas simples de RNA senso positivo, e as enzimas virais, protease, integrase e a transcriptase reversa. A ilustração refere-se à ampliação de regiões genômicas do RNA viral. As moléculas de RNA que codificam os genes virais possuem cerca de 10 Kb. Da esquerda para a direita, está destacado o loci do gene *gag*, em seguida do gene *pol*, gene *nef*, gene *tat* e o gene *env*. Flanqueando os genes encontram-se as regiões 5' LTR e 3' LTR. Adaptado de Robbins et al., (2004).

A próxima fase da doença é denominada de latência clínica. Nesse estágio, aparecem alterações hematológicas, anemia normocrômica e normocítica, leucopenia e plaquetopenia e a contagem de LT-CD4+ permanece acima de 350 células/mm<sup>3</sup>. A imunossupressão grave ocorre quando os LT-CD4+, situam-se entre 200 e 300 células/mm<sup>3</sup>. Abaixo de 200 células/mm<sup>3</sup>, observa-se o desenvolvimento de miocardiopatias, nefropatias, neuropatias, infecções oportunistas, e neoplasias definidoras da Aids (SILICIANO et al., 2011).

### 3.1.1 Replicação do HIV e ferro

Após o contato com o organismo humano, o vírus HIV procura meios de reprodução para disseminar-se. Para que tal evento ocorra, é necessário a entrada do vírus ao ambiente intracelular. A infecção pelo HIV é marcada pela acentuada depleção de linfócitos CD4+, sendo estes,

essenciais a defesa imunológica, porém células de linhagem monocítica também são afetadas. Essas células são acometidas pois possuem a molécula CD4 e os receptores de quimiocinas—família de receptores acoplados à proteína G— CCR5 (linfócitos) e CXCR4 (monócitos/macrófagos) (MOORE et al., 1997).

A fusão do HIV-1 a célula hospedeira começa com a interação entre a glicoproteína gp120, a molécula CD4 e um correceptor de entrada (CCR5 ou CXCR4). Após, o RNA viral é transcrito em DNA, pela enzima transcriptase reversa. Este passo é dependente de ferro, uma vez que para ocorrer a transcrição reversa, é necessário dNTPs (desoxirribonucleotídeos fosfatados), e a enzima ribonucleotídeo redutase, possui um sítio de ligação dependente de ferro não-heme (SANVISENS et al., 2016; 2011).

Após a etapa de transcrição, é necessário que o DNA viral seja integrado, pela enzima integrase ao genoma do hospedeiro. Em seguida, o fator nuclear *kappa* B (NF- $\kappa$ B) liga-se a região terminal 5' LTR (*Long terminal repeat*) do DNA e medeia a transcrição dos genes virais. As regiões LTRs são encontradas nas extremidades de moléculas de DNA retroviral, flanqueando genes funcionais. O ferro ativa o NF- $\kappa$ B gerando EROs, que ativam a I $\kappa$ B quinase (IKK), levando a migração do NF- $\kappa$ B para o núcleo (STROUD et al., 2009; SACHDEVA et al., 2013).

Para que ocorra a transcrição eficiente do genoma do HIV, é necessário que ocorra um complexo entre a proteína Tat, CDK9 e a ciclina T1. A proteína Tat é uma proteína transativadora, ou seja, produz ou gera determinadas proteínas com funções específicas a sobrevivência do vírus. O complexo Tat/CDK9/Ciclina T1 promovem a transcrição completa do genoma viral, formando os RNAs do HIV. Quando a concentração de ferro intracelular é reduzida ou escassa, não ocorre a formação do complexo, uma vez que, a ligação do complexo a região TAR (*transactivation responsive region*) no genoma viral é dependente de ferro (MBONYE et al., 2013; MALINA et al., 2016; PAPANIDIS et al., 2017).

Após a formação do RNA viral, o mesmo permanece no núcleo, sendo necessário a exportação para o citoplasma da célula. Essa exportação é necessária, pois, caso o RNA permaneça no núcleo celular, os genes virais podem ser codificados e expressos, impedindo a formação de novas partículas virais. A exportação nuclear é mediada após a formação do complexo Rev/eIF5a/HY. A proteína Rev do HIV migra para o núcleo e liga-se em uma região do RNA mensageiro, RRE (*Rev*

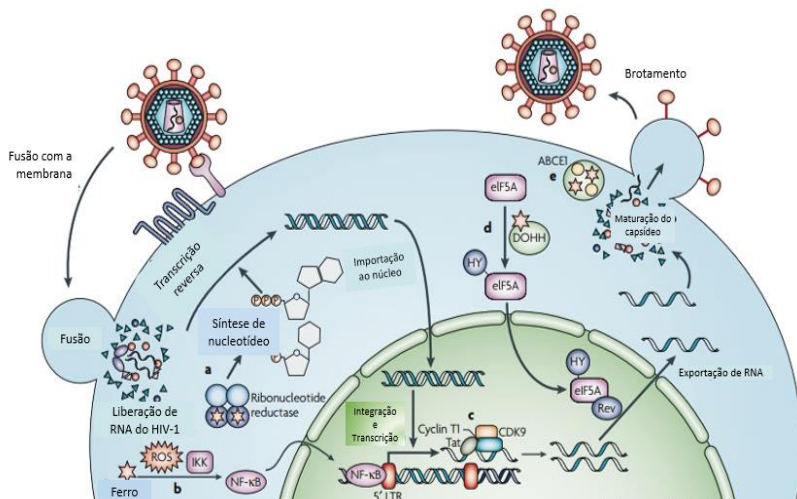


*response elemento*) impedindo a degradação do RNA (MANCONE et al., 2017).

A proteína Rev ativa o eIF5a (*eukaryotic initiation factor 5A*). O eIF5A é um complexo citoplasmático do hospedeiro essencial para a viabilidade celular, fazendo parte do metabolismo de RNAm, de mecanismos traducionais e transporte núcleo-citoplasma. Esse fator é a única proteína descrita que contém o resíduo de aminoácido hipusina (HY). Sendo esse resíduo, necessário para sua função. O HY é derivado de modificações pós-tradução de um resíduo de lisina. Essa reação ocorre através da ação de duas enzimas que utilizam ferro como cofator, a hipusina sintetase e a desoxi-hipusina hidroxilase (DOHH, *deoxyhypusine-hydroxylase*). Ao inibir a síntese de HY bloqueia-se a replicação de HIV-1 (CÁCERES et al., 2016; HOQUE et al., 2009; 2017).

A última etapa para a formação completa do vírus HIV, o *vírion*, que requer ferro é a montagem das proteínas do capsídeo derivadas do gene *Gag*. Para que a maturação ocorra, é necessário a proteína ABCE1 da célula hospedeira, uma ATPase dependente de ferro. Nas células infectadas com HIV-1, a proteína ABCE1 é encontrada na periferia celular perto de *vírions* completos ou em desenvolvimento. Sua função é regular a maturação completa do capsídeo alterando a atividade da protease do HIV até a fase final de brotamento (MANCONE et al., 2017). A Figura 2 ilustra a replicação do HIV-1 dependente de ferro.

**Figura 2. A utilização do ferro para a replicação do vírus HIV-1**



Podemos citar cinco etapas principais em que o ferro é utilizado na replicação e sobrevivência do HIV-1, demonstrados na figura. **a)** A utilização de ferro pela enzima ribonucleotídeo reductase na síntese de nucleotídeos. **b)** O ferro intracelular, gera espécies reativas de oxigênio, ativando a via NF-κB, o qual migra para o núcleo, auxiliando a transcrição do genoma viral. **c)** A proteína Tat fosforila a proteína ciclina TI, que forma um complexo com a proteína CDK9, a formação deste complexo é dependente de ferro. **d)** O complexo eIF5A-REV é responsável pela exportação do RNA mensageiro viral para o citoplasma, este processo é dependente de ferro. **e)** A última etapa dependente de ferro, é a maturação do capsídeo que necessita das proteínas ABCE1 humanas, dependentes de ferro. Fonte: figura adaptada e cedida pelo autor Drakesmith et al., (2008).

### 3.1.2 HIV-1 e inflamação

A infecção pelo vírus HIV-1 promove uma desregulação no sistema imune inato e humoral. A ativação de linfócitos CD8+ citotóxicos com atividade antiviral modula a evolução da doença, juntamente com a carga viral. Embora a carga viral plasmática diminua após a fase de infecção aguda e com o tratamento antirretroviral, o sistema imune permanece ativado no estágio crônico da Aids. A produção acentuada e desregulada da interleucina-15 (IL-15), aumenta a proliferação de células LT-CD8+, com depleção de LT-CD4+ (NASI et al., 2018).

Atualmente o desafio no tratamento da Aids é a inflamação crônica e as doenças originadas devido a ativação constante do sistema imune. Durante a progressão da doença ocorre um aumento na concentração de citocinas, como TNF- $\alpha$ , que provoca morte celular, ativação constante do sistema complemento, aumento de IL-1 $\beta$ , IL-6, proteína C reativa (PCR), dímero D. Em concentrações fisiológicas, elas são benéficas, porém em excesso, alteram a produção de precursores eritróides e outras linhagens celulares (VIGANO et al., 2015).

### 3.1.3 Alterações hematológicas em indivíduos portadores de HIV-1

A hematopoiese refere-se à formação e desenvolvimento de células sanguíneas na medula óssea. A infecção pelo vírus HIV-1 altera o microambiente medular, dificultando a proliferação e diferenciação celular. Em determinados indivíduos portadores do vírus HIV-1 pode-se encontrar anemia, devido ao aumento da eritrofagocitose durante a infecção aguda e pela baixa disponibilidade de ferro dos macrófagos medulares a eritroblastos, bem como, pela ação do vírus no nicho hematopoietico. Outras alterações incluem pancitopenia, distúrbios linfoproliferativos e malignidades (COSBY et al., 2007; PASCUTTI et al., 2016).

A pancitopenia é caracterizada pela diminuição acentuada de todas as linhagens celulares. Percebe-se com a progressão da doença, diminuição de célula da linhagem mielóide, responsáveis por funções de mediação e ativação do sistema imune inato. A neutropenia é frequente, acompanhada de infecções por microrganismos bacterianos gram-positivos (OTITI-SENGERI et al., 2018).

A terapia antirretroviral altamente ativa (HAART, *highly active antiretroviral therapy*), que traz uma combinação de diferentes medicamentos para tratamento de HIV/AIDS, também promove

alterações hematológicas. Alguns medicamentos são mielossupressores, e podem, em alguns casos, causar aplasia da medula, como por exemplo, a zidovudina (AZT) (SHI et al., 2014; KOKA et al., 2004; LI et al., 2017).

Indivíduos infectados pelo HIV-1 apresentam quadros hemorrágicos, ou tendência a sangramentos devido a trombocitopenia, definida por contagem de células plaquetárias inferior a  $150 \times 10^6/\text{mm}^3$ . Estudos descrevem que cerca de 4-24% de casos de infecção pelo HIV apresentam trombocitopenia, mesmo realizando tratamento. A trombocitopenia é considerada um preditor independente de morbimortalidade entre o grupo infectado pelo HIV, devido ao aumento do risco de hemorragia, ocorrendo nas mucosas, na pele, nos tecidos moles e em regiões intracranianos (TAREMWA et al., 2015).

### **3.1.4 Anemia em indivíduos HIV-1**

A deficiência de ferro (DF) e a anemia ferropênica (ADF) são situações clínicas distintas, embora sejam frequentemente utilizadas como sinônimos. Capellini et al., (2015) define "A deficiência de ferro é uma condição relacionada à saúde em que a disponibilidade de ferro é insuficiente para atender às necessidades do organismo e que pode ser apresentada com ou sem anemia".

Na deficiência de ferro as reservas de ferro estão reduzidas (ferritina  $<12 \mu\text{g/L}$ ), mas o seu fornecimento para a eritropoiese é mantido. A ADF ocorre quando não existe ferro disponível para a eritropoiese, caracterizando uma diminuição na síntese de hemoglobina. Quando a ADF é desenvolvida de forma lenta e progressiva, torna-se bem tolerada ao organismo, dificultando seu diagnóstico (CHENG et al., 2011).

A anemia é definida como uma deficiência de glóbulos vermelhos e o teor de hemoglobina (Hb) inferior a  $12\text{g/dL}$  em indivíduos do gênero feminino e  $13\text{g/dL}$  em indivíduos do gênero masculino. A causa mais frequente do desenvolvimento da anemia é deficiência de ferro, porém, a deficiência de folatos, de vitamina B12, perda de sangue crônica por parte do trato gastrointestinal, insuficiência renal ou mielossupressão, também podem causar anemia (WHO, 2001).

A deficiência de ferro em indivíduos portadores de HIV/AIDS está associada a ineficiência da entrega de ferro dos monócitos aos eritroblastos na medula óssea. Outro fator que favorece o desenvolvimento da deficiência de ferro é o bloqueio dos estoques de ferro nas células medulares, dificultando a eritropoiese. Sendo que a

retenção dos estoques de ferro favorece a replicação do vírus na medula óssea, uma vez que, foi encontrado DNA pró-viral em células estaminais com concentração de ferro normal e/ou aumentada (SULLIVAN et al., 1998).

A anemia da doença crônica ou anemia da inflamação refere-se à produção prejudicada de eritrócitos associados a doenças inflamatórias crônicas, incluindo câncer, infecção crônica ou doenças autoimunes. Dados recentes indicam que a anemia também pode ocorrer em situações de inflamação grave e aguda, ou com sinais inflamatórios persistentes que ocorrem na obesidade, envelhecimento e insuficiência renal. A anemia da inflamação é definida por baixa concentração de ferro sérico ( $<60 \mu\text{g/dL}$ ) com ferritina sérica normal ou elevada ( $>12 \text{ ng/mL}$ ) e saturação de transferrina em torno de 15% (CHENG et al., 2011).

O quadro clínico da anemia, estabelecido na AI, em indivíduos com HIV/AIDS é devido à produção de citocinas como IL- $1\beta$ , INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  que influenciam negativamente a eritropoiese, inibindo a produção de eritropoietina (EPO). Além disso, quando a concentração de eritropoietina diminui, há um aumento na síntese hepática de hepcidina. Outras proteínas e peptídeos infamatórios que influenciam a alteração do metabolismo do ferro através da modulação da expressão de hepcidina são interleucina IL-6, IL- $1\beta$ , IL-22 e INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Essas citocinas atuam sobre o gene *HAMP* através da ativação da via de sinalização JAK-STAT (D'ANGELO et al., 2013). Essa via de sinalização será abordada adiante.

Devido à intensa produção de mediadores inflamatórios, a concentração sérica de hepcidina é alta, restringindo a mobilização de ferros de ferritina em enterócitos e hepatócitos e dificultando o fornecimento de ferro por macrófagos na medula óssea para gerar novos precursores eritróides. Devido a este fato, a ferritina sérica é elevada e a transferrina apresenta-se diminuída (FRAENKEL et al., 2015;2017).

A incidência da anemia aumenta com a progressão da doença de Aids. A anemia é encontrada em cerca de 3% dos indivíduos com infecção assintomática pelo HIV, aproximadamente em 12% dos indivíduos com contagem de LT-CD4+ inferiores a 200 células/mm<sup>3</sup> e em torno de 37% em indivíduos com a doença de Aids sem tratamento. Entretanto, mesmo com a utilização da TARV em torno de 35% dos portadores de HIV/AIDS desenvolvem anemia em algum momento do decorrer da doença (VISHNU et al., 2015).

### 3.2 PEPTÍDEO HEPCIDINA

A molécula hepcidina (“Hep” origem hepática; “cidin” atividade antimicrobiana) foi descrita ano 2000, sendo caracterizada como um peptídeo antimicrobiano atuando em parte na imunidade inata, por apresentar atividade imunológica de  $\beta$ -defensina. Inicialmente chamada de LEAP-1 (*Liver-Expressed Antimicrobial Peptide*), foi isolada de ultrafiltrados de sangue humano e da urina na sua forma ativa, como um peptídeo rico em cisteínas. Em seguida, foi descrito sua origem, que inicialmente acreditava-se ser exclusivamente hepática (KRAUSE et al., 2000; PARK et al., 2001).

Todavia, sabe-se hoje que outras células como adipócitos, macrófagos, linfócitos, neutrófilos, células  $\beta$  pancreáticas, células renais e neurônios também produzem hepcidina (SOW et al., 2007; KULAKSIZ et al., 2008; BEKRI et al., 2008; PIGEON et al., 2001). Acredita-se que a produção extra-hepática de hepcidina auxilia na imunidade contra agentes patogênicos, tais como fungos, bactérias gram-negativas e alguns parasitas, enquanto a hepcidina hepática atua no metabolismo do ferro. Porém, existe controvérsias sobre essa hipótese (AGORO et al., 2016; HO et al., 2017).

A produção de hepcidina fisiologicamente ativa dá-se através de estímulos específicos em hepatócitos, no qual é originado inicialmente uma molécula imatura, sem atividade biológica denominada pré-pró-hepcidina, contendo 84 aminoácidos. Essa molécula, sofre uma clivagem proteolítica, dando origem a pró-hepcidina inativa, composta por 64 aminoácidos. Logo após, a enzima furina, cliva a molécula em uma região específica  $\text{NH}_2$ , para originar a hepcidina biologicamente ativa, composta por 8 resíduos de cisteína, ligados por 4 pontes bissulfeto contendo 25 aminoácidos (KRAUSE et al., 2000; PARK et al., 2001; PIGEON et al., 2001; VALORE et al., 2008).

A molécula ativa de hepcidina degrada-se na porção N-terminal, originando moléculas compostas por 20, 22, e 24 aminoácidos, na região em que ocorre a ligação entre hepcidina e ferroportina. Os peptídeos menores mostram uma perda progressiva de regulação da ferroportina, com acúmulo de ferritina intracelular (NEMETH et al., 2006).

#### 3.2.1 Metabolismo do ferro: renovação e equilíbrio

O ferro é um dos metais necessários a manutenção da vida. Faz parte de várias reações bioquímicas, atua como cofator em determinadas

enzimas, é necessário para a síntese de DNA, é um elemento primordial na cadeia respiratória, porém, a função mais importante é o transporte de oxigênio. O ser humano adquire ferro através da eritrofagocitose e da dieta (BRANNON et al., 2017).

A reciclagem de eritrócitos senescentes fornece cerca de 90-95% do ferro necessário para as funções fisiológicas e para a eritropoiese (KNUTSON et al., 2005; KOSKENKORVA-FRANK et al., 2013). Os enterócitos presentes no duodeno e na porção proximal do jejuno absorvem cerca de 1 a 10mg de ferro proveniente da alimentação, para manter os estoques de ferro (EVSTATIEV et al., 2016).

O ferro oriundo de alimentos, pode ser heme ou não-heme. Na membrana citoplasmática dos enterócitos, estão presentes as enzimas redutases férricas apicais, como a enzima citocromo b duodenal (dCytB). A dCytB promove a redução do ferro do estado férrico ( $Fe^{+3}$ ), não-heme, ao seu estado ferroso ( $Fe^{+2}$ ), heme, e consequente mobilização do ferro ferroso através do transportador de metal divalente tipo-1 (DMT-1). Sendo que o ferro heme é internalizado pela proteína transportadora de heme-1 (HCP-1) para às células, onde é armazenado na forma de ferritina (KRISHNAMURTHY et al., 2007; MUNÕZ et al., 2010; GULEC et al., 2014).

Quando a concentração sérica de ferro esta baixa, ocorre a mobilização dos estoques de ferro através da ferroportina para o meio extracelular. O ferro liberado está em seu estado ferroso e para que ocorra a ligação com a transferrina sérica, deve ser oxidado ao seu estado férrico, uma vez que apenas o  $Fe^{+3}$  se liga à transferrina (CHEN et al., 2010).

A transferrina é a principal proteína transportadora de ferro no plasma, e o distribui ao organismo. A reação de oxidação de  $Fe^{+3} \rightarrow Fe^{+2}$  ocorre através da ação de enzimas oxidases: hefaestina, presente nos enterócitos, a ceruloplasmina, presente nos hepatócitos e no plasma, e o *zyklopen* na placenta (WANG et al., 2011; VASHCHENKO et al., 2013).

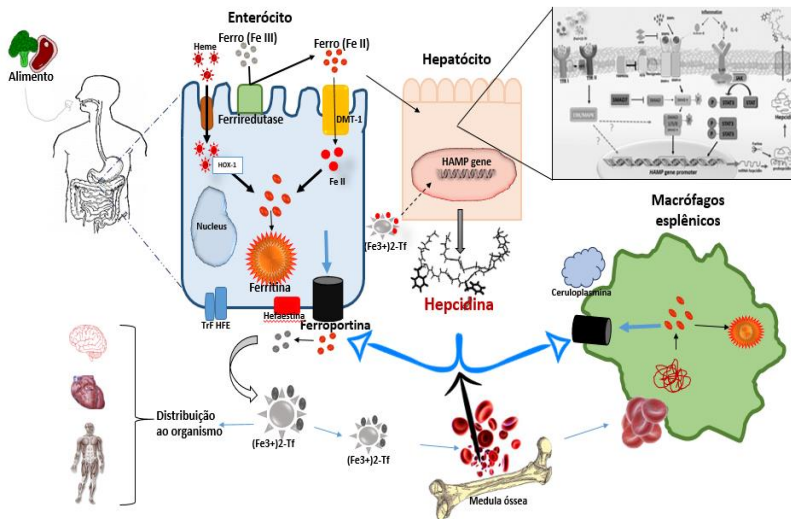
Fisiologicamente, cerca de 30% da transferrina é saturada com ferro. O estado de saturação reflete na quantidade de ferro circulante disponível as funções biológicas. A saturação de transferrina inferior a 15% indica hipoferremia e acima de 45% hiperferremia, situação ocorrida na hemocromatose. A dosagem da saturação de transferrina em laboratório clínico é um dos marcadores necessários para avaliar o metabolismo do ferro (KLEVEN et al., 2018; AZEVEDO et al., 2018).

A reciclagem de ferro pelos macrófagos ocorre através da fagocitose de eritrócitos senescentes, da fagocitose da hemoglobina e do grupo heme proveniente da hemólise intravascular. Uma vez

internalizado no macrófago, o grupo heme sofre ação da enzima heme oxigenase (HO) e libera o ferro no estado ferroso, que pode ser exportado para o meio extracelular pela ferroportina ou armazenado em forma de ferritina (SOE-LINS et al., 2009; ORIGASSA et al., 2013).

A maior concentração de ferro no organismo é armazenada na forma de ferritina ou hemossiderina, no fígado, no baço, no duodeno, na medula óssea e em outros órgãos. A molécula de ferritina é composta por 24 subunidades com um formato em “concha” esférica, a qual acomoda cerca de 4.000 átomos de ferro. A ferroportina medeia o efluxo dos estoques de ferro, sendo regulada negativamente pela hepcidina (NEMETH et al., 2009; HENTZ et al., 2010; WANG et al., 2011). A figura 3 ilustra o metabolismo do ferro, absorção, armazenamento e distribuição aos tecidos.

**Figura 3. Metabolismo do ferro regulado pela hepcidina**



A hepcidina é sintetizada no fígado, através de estímulos provenientes do ferro circulante no sangue, absorvido da dieta e da eritrofagocitose. O ferro absorvido é armazenado sob a forma de ferritina. Quando é necessário fisiologicamente, o ferro é deslocado para o meio extracelular, através da proteína transmembranar ferroportina, sendo distribuído ao organismo pela transferrina. A hepcidina liga-se a ferroportina bloqueando-a e impedindo a movimentação dos estoques de ferro. Fonte: Adaptado de REICHERT et al., 2017; 2018.



As dosagens dos marcadores do metabolismo do ferro são utilizadas para monitoramento e diagnóstico de anemias carenciais, sobrecarga de ferro e alterações bioquímicas e genéticas que envolvam a síntese do grupo heme e de hemoglobina. A avaliação laboratorial consiste na dosagem do ferro sérico, proveniente da dieta e da eritrofagocitose (FIBACH; BRISSOT et al., 2017).

A dosagem de ferritina plasmática, reflete na quantidade de ferro armazenado no interior das células. Porém, a ferritina é considerada uma proteína de fase aguda, podendo estar elevada durante processos infecciosos e doenças inflamatórias graves, gerando um resultado duvidoso. Para contornar tal problema, faz-se a mensuração de outros marcadores do metabolismo do ferro. Outro parâmetro analisado é a capacidade total de ligação ao ferro (CTLF) (NAIRZ et al., 2016).

O ferro liga-se fortemente a proteínas plasmáticas, porém com preferência pela transferrina. A quantidade de transferrina no sangue depende da função hepática e do estado nutricional do indivíduo. Em condições normais, cerca de 1/3 dos locais de ligação da transferrina estão saturados com ferro. Isso significa que 2/3 da capacidade de ligação permanecem vazios. As análises de transferrina, capacidade total de ligação do ferro, capacidade não saturada de ligação do ferro e saturação da transferrina avaliam essencialmente a mesma coisa, a capacidade do sangue de transportar o ferro e correlacionam-se com suas reservas (ASIF et al., 2016).

### **3.2.2 Ferroportina: receptor de hepcidina**

A ferroportina é uma proteína transmembranar, constituída de dímeros formados por monômeros, presente em hepatócitos, enterócitos, macrófagos, no baço e na medula óssea, que regula a quantidade de ferro presente no meio extra e intracelular. A hepcidina regula a ferroportina através de estímulos originados pela concentração de ferro sérico. A ligação do peptídeo maduro de hepcidina a ferroportina conduz a ligação da tirosina-quinase Jak2 a cada monômero de ferroportina (NEMETH et al., 2004; 2006).

Após a ligação entre Jak2 e ferroportina, ocorre a autofosforilação da Jak2, que fosforila, em seguida, a ferroportina. A ferroportina fosforilada liga-se à hepcidina, e ambas são internalizadas por cavidade revestidas por clatrina no interior da célula. Uma vez internalizadas, os fosfatos são removidos e a ferroportina é ubiquitinada no aminoácido lisina 253. A ubiquitinação é necessária para a entrada da ferroportina nos

corpos multivesiculares, que por fusão com lisossomas proporciona a degradação da ferroportina. Uma mutação no resíduo 253 não impossibilita a internalização da ferroportina, porém diminuí sua degradação (KAPLAN et al., 2011).

### 3.3 REGULÇÃO GÊNICA DA HEPCIDINA

O gene *HAMP* está localizado no cromossomo 19, na posição q13.12, apresenta 3 éxons e 2 íntrons. O éxon final codifica o mRNA da hepcidina. A modulação da transcrição gênica de hepcidina, ocorre devido a vários fatores, dentre os quais, destacam-se as concentrações séricas de ferro e transferrina, mediadores inflamatórios, estímulos provenientes da eritropoiese, bem como, a hipóxia tecidual e o estresse oxidativo (KIM et al., 2015; WANG et al., 2017).

Sabe-se que as vias de modulação intracelular do gene *HAMP* são sensíveis e de fácil ativação, portanto, uma concentração mínima de ferro circulante, ou sendo absorvido pelo enterócitos duodenais, é suficiente para o aumento da transcrição de hepcidina nos hepatócitos. Dentre alguns fatores que modulam a transcrição deste gene, destaca-se o teor de ferro e transferrina circulantes. A principal via ativada pela concentração de ferro é a via BMP/SMAD (BMPs : *Bone morphogenetic protein*; SMAD: *mothers against decapentaplegic*) (CASANOVAS et al., 2009).

A proteína HFE atua na regulação da transcrição de hepcidina através de sua interação com o receptor de transferrina (TfR). A HFE é deslocada do TfR1 como consequência das altas concentrações do complexo de transferrina-ferro [Tf-Fe<sup>+3</sup>] para promover sua interação com o receptor de transferrina 2 (TfR2). HFE e TfR2 ligam-se ao co-receptor de BMP, a proteína hemojuvelina (HJV), e ativam a transcrição do gene *HAMP* induzindo a via de sinalização BMP/SMAD (MIYAZAWA et al., 2002). Esta interação provoca a fosforilação do receptor BMP ativado, promovendo uma cascata de sinalização intracelular, por se ligarem a um complexo de receptores treonina/serina quinase tipo I e tipo II (BABITT et al., 2007).

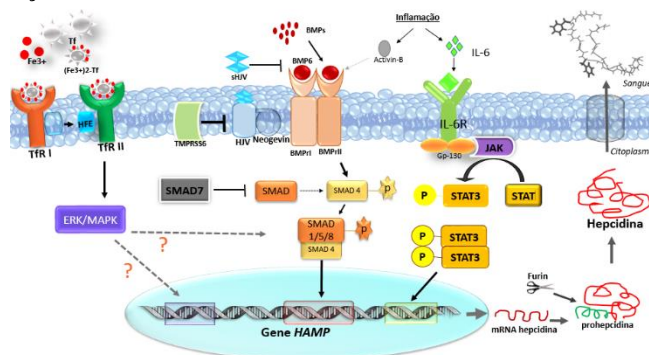
O receptor BMP tipo II ativado ativa o receptor BMP tipo I, que em seguida, transmite o sinal para o receptor regulador de SMAD, (R-SMAD), fosforilando o SMAD-1, SMAD-5 e SMAD-8. Dessa forma, ocorre a formação de um complexo de transcrição envolvendo o fator SMAD-4. O complexo ativado se desloca para o núcleo, a fim de regular a transcrição gênica (LIN et al., 2007). O SMAD-4 e a proteína matriptase-2 (TMPRSS6) atuam como supressores da ativação da via

BMP/SMAD. A matriptase-2 interage com a proteína hemojuvelina, fragmentando-a em hemojuvelina solúvel (HJVs), que bloqueia a ativação da via BMP/SMAD (MLECZKO-SANECKA et al.,2010; De FALCO et al., 2013).

A segunda via de sinalização JAK (*Janus kinase*)/STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) é induzida através de estímulos inflamatórios, de acordo com a figura 4 (PARK et al., 2001). A regulação do gene *HAMP* através da via JAK/STAT inicia quando ligantes específicos atuam sobre os receptores JAKs gerando uma multimerização de suas subunidades (RAWLINGS et al., 2004).

A IL-6 liga-se a seu receptor, o qual é formado por duas subunidades, uma subunidade alfa (IL-6-R) e outra subunidade beta (gp130). Quando a IL-6 liga-se a IL-6-R ocorre uma dimerização da gp130, que recruta a JAK citoplasmática para fosforilar a proteína gp130. Após a fosforilação, proteínas STATs (STAT 1 e STAT 3), se ligam a gp130 e se autofosforilam, em seguida migram para o núcleo em sítios de transcrição específicos do gene *HAMP*, promovendo o aumento da transcrição do mRNA de hepcidina nos hepatócitos (FLEMING, 2007; PIETRANGELO et al., 2007).

**Figura 4. Regulação do gene *HAMP* através de estímulos inflamatórios e concentração de ferro**



A figura ilustra a expressão de hepcidina, por estímulos inflamatórios através da ativação da via JAK/STAT. A concentração de ferro sérico aumenta a concentração das proteínas BMPs, que após, se ligam a seus receptores ativando a via SMAD. A concentração de transferrina sérica estimula a transcrição de hepcidina por mecanismos ainda não comprovados. A transcrição do gene *HAMP* dá origem a pró-hepcidina, que após clivada pela enzima furina, origina a hepcidina biologicamente ativa. A proteína TMPRSS6 e HJV atuam inibindo a transcrição de hepcidina pela via SMAD. Fonte: Adaptado de REICHERT et al., 2017.

### 3.3.1 Variações polimórficas do gene *HAMP*

De maneira geral, uma alteração genética é classificada de acordo com a sua frequência populacional. Considera-se mutação, quando a frequência de um determinado alelo na população estudada for menor que 1% (<1%), e é considerado um polimorfismo quando a frequência alélica for superior a 1% (>1%) (KWOK et al., 2000).

A localização de uma variante alélica em um gene determina se a alteração pode ou não ser considerada relevante clinicamente. Alguns polimorfismos podem estar presentes em regiões intrônicas e não alterar a função do gene. Outros podem estar localizados em sequências codificantes dos próprios genes e resultar em proteínas variantes diferentes que, por sua vez, levam a diferenças distintivas em populações humanas. Outros ainda estão em regiões reguladoras e também podem ter efeitos sobre a transcrição ou a estabilidade do mRNA (SAUER et al., 2002).

Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs, *single nucleotide polymorphisms*) são os mais frequentes. Um *locus* caracterizado por um SNP geralmente tem apenas dois alelos, que correspondem a duas bases diferentes que ocupam uma localização específica no genoma. As principais variantes polimórficas descritas do gene *HAMP* têm sido associadas ao agravo e a modulação da sobrecarga de ferro na hemocromatose hereditária, principalmente do tipo B, ou hemocromatose juvenil (LIU et al., 2016; KAWABATA et al., 2018).

Alguns polimorfismos ocorrem em associação com outros polimorfismos de genes diferentes e quando combinados, aumentam a patogenicidade. Os polimorfismos do gene *HAMP* geralmente encontram-se associados a outros genes que codificam proteínas relacionadas ao metabolismo do ferro. A exemplo, é a combinação do polimorfismo do gene *HFE* c.845G> A; p.C282Y com o polimorfismo da região promotora do gene *HAMP* nc.-1010C> T e nc.-582A> G. quando associados, a concentração sérica de ferritina é superior a 300 µg/L, e a hepcidina não é transcrita (SILVA et al., 2014).

As alterações genéticas do gene *HAMP*, também estão associadas a deficiência de ferro, e ao desenvolvimento de anemias graves. Uma mutação no gene *TMPRSS6*, que codifica a proteína maptriptase-2, diminui a concentração sérica de hepcidina. A anemia desenvolvida é microcítica e hipocrômica, com teor de hemoglobina inferior a 9g/dL. Conhecida como IRIDA (*Iron-refractory iron deficiency anemia*), ou anemia ferro refratária, o indivíduo desenvolve anemia por deficiência de

ferro, porém não responde ao tratamento com ferro oral ou parenteral. Devido ao aumento na concentração sérica de hepcidina o ferro não é absorvido nos enterócitos duodenais e também não é internalizado nas células (NICOLAS et al., 2002; HEENEY et al., 2014; CAPRA et al., 2017; SAL et al., 2016; PINTO et al., 2017).

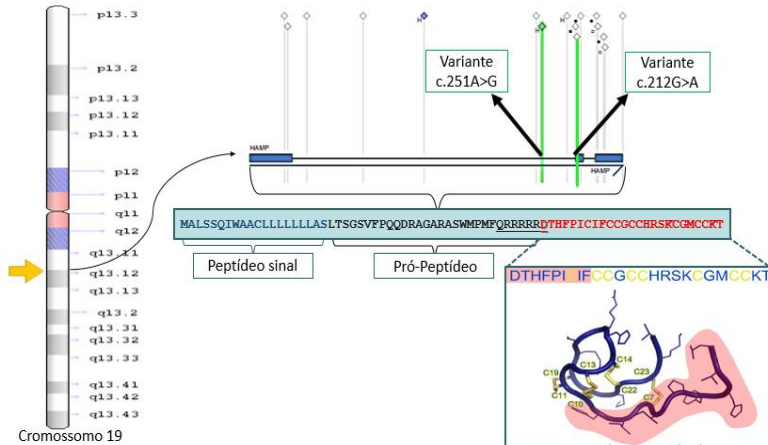
O gene *HAMP* apresenta várias regiões polimórficas. As variações gênicas foram descritas no ano de 2010, por meio do projeto *HapMap*. Brevemente, este projeto foi elaborado a fim de mapear e descrever as alterações genéticas presentes na população, em uma variação superior a 1%. Esse processo de mapeamento de 1000 genomas, visa facilitar os estudos clínicos relacionados a polimorfismos, sendo que, uma vez descritos, faz-se necessário apenas correlaciona-los com fenótipos clínicos (ANTAO et al., 2010; ZHANG et al., 2015; BUCHANAN et al., 2012).

Muitos estudos têm demonstrado a função clínica de determinados SNPs que não estejam relacionados com o excesso do acúmulo de ferro. Dentre os quais, destaca-se a variante c.251A>G (rs7251432) presente no íntron 1 do gene *HAMP*, que foi associada a um aumento da concentração de ferritina e sobrecarga de ferro (MILET et al., 2007). Porém alguns autores não conseguiram descrever a associação deste polimorfismo com concentrações séricas de ferro (HUANG et al., 2008; FAIRWEATHER-TAIT et al., 2013; CHEN et al., 2016).

A variante c.212G>A (rs104894696), na qual ocorre a alteração da carga do aminoácido 71, presente entre a terceira e quarta cisteína da molécula hepcidina, resíduos 70 e 72, foi associada a sobrecarga de ferro branda. Esta alteração neutra a ácida, no final da primeira folha  $\beta$  da molécula, é suscetível de ser funcionalmente significativa, por ser a região de interação entre hepcidina e ferroportina (MERRYWEATHER-CLARKE et al., 2003). Além disso, os polimorfismos do gene *HAMP* (rs7251432 e rs2293689) estavam significativamente correlacionados com o risco de desenvolvimento da doença de Kawasaki (HUANG et al., 2017).

Outros polimorfismos do gene *HAMP* foram descritos, porém ainda não têm estudos de correlação ou significado clínico. Os polimorfismos c.251A>G e c.212G>A estão representados na figura 5 e foram escolhidos para serem analisados neste trabalho, devido a sua localização no gene, na região que codifica a molécula completa da hepcidina.

**Figura 5. Ilustração do gene *HAMP* e suas regiões polimórficas**



A seta amarela, a esquerda, indica a localização no gene *HAMP* no cromossomo 19, região q13.12. A figura central representa o gene completo, da esquerda para a direita, está representado em azul, o éxon 1, éxon 2 e éxon 3, as regiões entre os éxons, são as intrônicas. As regiões destacadas em verde representam a localização das variantes estudadas. O quadro em azul, destaca a sequência peptídica completa da molécula hepcidina. A sequência destacada em vermelho faz parte do peptídeo maduro de 25 aminoácidos, e a região destacada em rosa, refere-se a região da molécula que se liga a ferroportina. Fonte: Adaptado de Ganz, (2011) e GIRELLI (2016); e elaborado pela Autora.

### 3.4 HEPCIDINA, FERRO E HIV-1

Diferentes estudos sugerem que os estoques de ferro celular influenciam no curso e progressão da infecção pelo HIV-1 em humanos. Elevadas concentrações de ferro estão associadas com aumento da mortalidade e com o aumento da carga viral do HIV-1, elevando significativamente a predisposição para infecções oportunistas, além de alterar a resposta imune e o grau de imunodeficiência (GORDEUK et al., 2006; MCDERMID et al., 2007). Em estudos, Debebe et al. (2007 e 2011) mostraram que a remoção de ferro através do uso de quelantes de ferro em cultura celular, influenciou na replicação do HIV-1 ao inibindo sua transcrição.

Por sua vez, Xu et al. (2010) sugeriram que a hepcidina e o efluxo de ferro mediado pela ferroportina poderia afetar a regulação da transcrição do HIV-1. O aumento dos estoques de ferro foi associado com uma rápida progressão da infecção pelo HIV-1 em portadores de

talassemia maior que fizeram suplementação de ferro por via oral e, em indivíduos HIV-1 positivos que apresentavam polimorfismos da haptoglobina. Sendo que elevadas concentrações de ferro em monócitos medulares estão associadas a uma correlação inversa de sobrevida em indivíduos portadores do vírus HIV-1 (GORDEUK et al., 2001).

Estudos em população de indivíduos soropositivos para HIV-1 mostraram que em mulheres com HIV-1 sem diagnóstico de anemia, altas concentrações de ferritina estavam associadas a um aumento da carga viral, sugerindo que elevados estoques de ferro poderiam influenciar na infecção pelo HIV-1 (RAWAT et al., 2008), assim como altas concentrações de ferro mostraram-se como um fator preditivo de alta mortalidade em adultos infectados (MCDERMID et al., 2007).

Por sua vez, em estudo realizado *in vitro* com cultura de células da linhagem CEM T, Traoré et al. (2004) mostraram que o excesso de ferro poderia estar associado com um aumento da replicação viral, e que o uso do quelante de ferro desferrioxamina propiciou uma redução da replicação viral. Ainda, o uso dos quelantes deferoxamina e deferiprona inibiram a replicação viral em macrófagos e linfócitos de sangue periférico humano de indivíduos soropositivos para o HIV-1 (GEORGIU et al., 2000; HERINGTON et al., 2007).

Outros estudos sugerem que a relação entre hepcidina e a anemia de doença crônica, aumentam o risco de coinfeções, principalmente a tuberculose em indivíduos HIV-1, estando associada a mortalidade (KERKHOFF et al., 2016). E que a concentração sérica de hepcidina correlaciona-se negativamente com o número de LT-CD4+, sendo um indicador de mau prognóstico (ARMITAGE et al., 2016; MINCHELLA et al., 2014; WISAKSANA et al., 2013).

Como descrito anteriormente, a hepcidina apresenta um papel central na regulação do metabolismo de ferro, controlando o efluxo intracelular de ferro através de sua ligação com a ferroportina em enterócitos, macrófagos/monócitos, linfócitos, dentre outras células, em um mecanismo de *feedback* negativo. Contudo, a compreensão do papel da hepcidina no controle do metabolismo do ferro, e o seu impacto sobre a replicação viral do HIV-1 em indivíduos soropositivos permanecem desconhecidos.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Verificar se a concentração sérica de hepcidina pode afetar o metabolismo do ferro e influenciar na replicação do vírus HIV-1, em indivíduos soropositivos para o HIV-1.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar os marcadores de infecção pelo HIV-1 : CD4+, CD8+ e RNA-HIV-1;
- Determinar os índices hematimétricos (VCM, HCM e CHCM) e as concentrações de Hemoglobina (Hb) em indivíduos HIV-1;
- Quantificar as concentrações séricas/plasmáticas dos biomarcadores do metabolismo do ferro : ferro sérico, ferritina sérica, saturação de transferrina e capacidade total de ligação do ferro.
- Quantificar as concentrações séricas de interleucina-6 e Proteína C Reativa;
- Determinar as concentrações séricas de hepcidina;
- Fazer a genotipagem dos polimorfismos c.251A>G e c.212G>A do gene *HAMP*;
- Determinar a frequência de anemia de doença crônica e anemia ferropênica em indivíduos HIV-1.



## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 ASPECTOS LEGAIS DA BIOÉTICA

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (CEPSH-HU UFSC), Número do CAAE: 53371315.3.0000.0121; número do Parecer: 1597576.

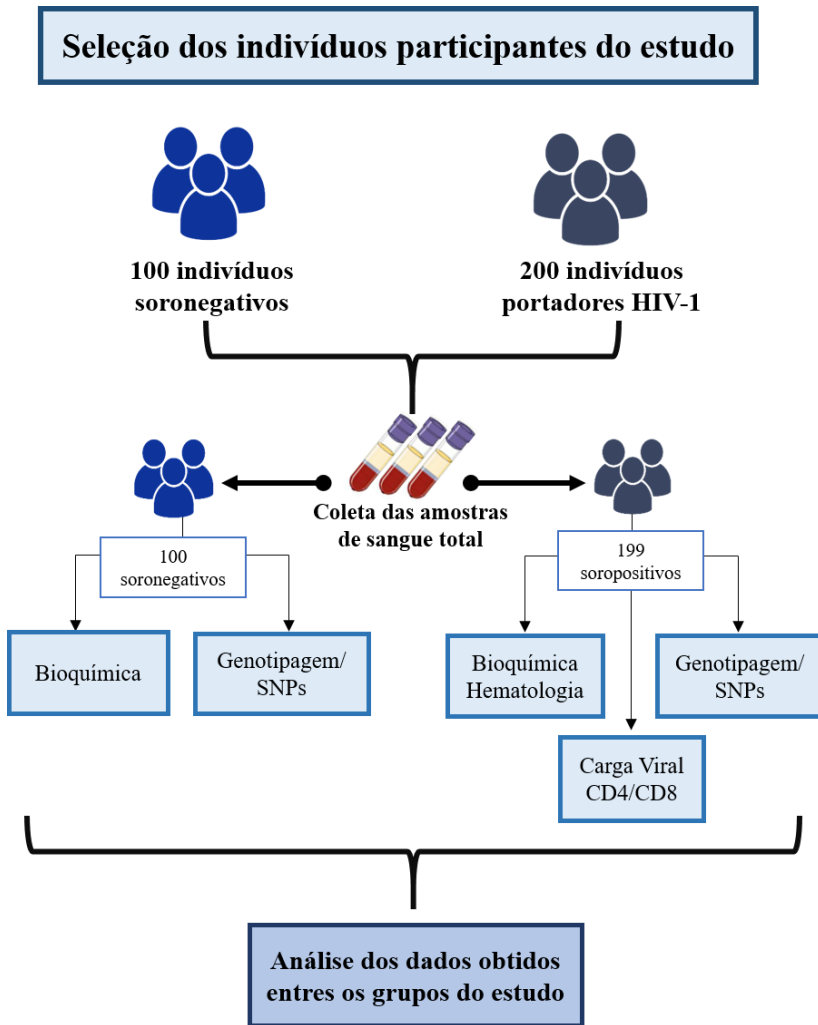
### 5.2 CASUÍSTICA

Este é um estudo transversal, com tempo de execução de dois anos, de janeiro de 2016 a dezembro de 2017. Foram convidados a participar deste estudo randômico um total de 300 indivíduos de ambos os gêneros, com idade entre 18 e 65 anos. Deste total, 200 indivíduos eram comprovadamente soropositivos para o HIV-1, diagnosticados por dois métodos com princípios metodológicos distintos: imunoenzimáticos (ELISA) e imunofluorescência indireta (IFI) de acordo com o protocolo nacional de diagnóstico de HIV-1 no Brasil.

A triagem clínica foi efetuada por médicos infectologistas, e os indivíduos devidamente esclarecidos e que decidiram em participar do estudo, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Após consentimento, foi realizada a coleta de material biológico (sangue) para determinação dos parâmetros laboratoriais dos marcadores de infecção pelo HIV-1 no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (LACHU/UFSC).

Após a triagem clínica e ter assinado o TCLE, um indivíduo desistiu da pesquisa, ficando um total de 199 indivíduos HIV-1 soropositivo. Adicionalmente, foi incluído no estudo 100 indivíduos soronegativos para o HIV-1, que serviram como controle negativo para carga viral dos indivíduos comprovadamente soropositivos para o HIV-1, provenientes do Banco de Sangue do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (BS-HU/UFSC). A coleta da amostra biológica foi realizada durante a doação de sangue. O esquema abaixo (Figura 6) ilustra de forma resumida o desenho de estudo do projeto realizado.

Figura 6. Desenho do estudo realizado



(SNPs) *Single nucleotide polymorphisms*. Fonte: A autora.

### 5.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Não participaram do estudo todos aqueles indivíduos que fizeram ou faziam no ato da coleta, uso de qualquer tipo de terapia de reposição de ferro e/ou relacionada ao controle e regulação do metabolismo de ferro no organismo, em período igual ou inferior a seis meses do dia da coleta de sangue. O uso de anti-inflamatórios esteroidais e não esteroidais, estatinas e hipolipemiantes em igual ou inferior período também foram fatores de exclusão, bem como o consumo de álcool, tabaco, doenças renais, doenças hepáticas, sinais de inflamação e indivíduos que tinham recebido sangue nos últimos 30 dias. O diagnóstico de coinfeção pelos vírus da hepatite B (HBV) ou C (HCV), e a presença de sinais clínicos agudos de doenças oportunistas, como diarreia, eczemas, pneumonia e outros, que caracterizavam perda ou alteração do metabolismo do ferro, também foram fatores excludentes. Os critérios de exclusão foram os mesmos para indivíduos com sorologia positiva para HIV-1 e para indivíduos não portadores do vírus.

### 5.4 COLETA E FRACIONAMENTO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

As amostras biológicas de sangue foram coletadas por punção antecubital, pela manhã, após jejum de 8 a 12 horas. Foram utilizados tubos com sistema a vácuo (Vacutainer<sup>®</sup>, Becton/Dickinson, NJ, USA). As amostras de soro e plasma foram obtidas por centrifugação do sangue em centrífuga clínica Celm, modelo LS-II, a 2500 rpm (1050 x g), durante 10 minutos. Em seguida, foram novamente centrifugadas a 2500 rpm (1050 x g) por mais 10 minutos, para evitar a contaminação com hemácias e outras eventuais interferências nas determinações. Alíquotas (n=3) de 200 µL foram transferidas para tubos criogênicos e em seguida armazenadas em freezer -70°C até a data das análises.

### 5.5 QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL (RNA) DO HIV-1

As determinações foram realizadas em sangue total, centrifugado a 1500 rpm/10 minutos para separação do plasma. A quantificação das partículas foi realizada por metodologia *Nucleic Acid Sequence-Based Amplification* (NASBA) através do teste NucliSens HIV-1 QT (Organon Teknika, Boxtel, NL). O método permite a detecção de RNA-HIV-1 acima de 50 cópias/mL.

## 5.6 QUANTIFICAÇÃO DOS LINFÓCITOS T-CD4+ E T-CD8+

As quantificações dos linfócitos T-CD4+ e T-CD8+ foram realizadas por citometria de fluxo, modelo FACS Calibur, com software BD MultiSet (Becton/Dickinson, NJ, USA). As Amostras de sangue total foram coletadas em tubos contendo EDTA, sistema a vácuo (Vacutainer®, Becton/Dickinson, NJ, USA). A quantificação foi feita com conjuntos reativos de anticorpos monoclonais CD4+:CD3+ e CD8+:CD3+ (Becton/Dickinson, NJ, USA) para os linfócitos T-CD3+, T-CD4+ e T-CD8+.

## 5.7 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

As determinações dos parâmetros hematológicos foram realizadas em amostras de sangue coletas com EDTA e analisadas em processo automatizado ABX Pentra DF 120 (ABX Pentra, Horiba Diagnostics Inc., Kyoto, Japan). Foram analisados a quantidade de eritrócitos, teor de hemoglobina, VCM (volume corpuscular médio), HCM (hemoglobina corpuscular média), CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média), RDW (amplitude de distribuição dos eritrócitos), quantidade de plaquetas, VPM (volume plaquetar médio) e o hematócrito. Essas avaliações fazem parte do hemograma.

## 5.8 DETERMINAÇÃO DOS MARCADORES DE FERRO

As concentrações de ferro e a capacidade total de ligação ao ferro (TIBC: *total iron binding capacity*) foram analisadas pelo sistema automatizado ADVIA-2400 (Siemens Medical Diagnostics, Germany) e a concentração sérica de ferritina mensurada pelo sistema ADVIA-Centaur Immunoassay System (Siemens Medical Diagnostics, Germany). A saturação da transferrina (ST) foi calculada através da fórmula:  $ST (\%) = [\text{Ferro sérico } (\mu\text{g/dL}) \times 71] / \text{Transferrina sérica (mg/dL)}$ . Essa fórmula é calculada pelo equipamento.

## 5.9 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA C REATIVA E DE IL-6

A proteína C reativa foi determinada por um método de imunoenensaio turbidimétrico com auto analisador (Hitachi 902, Japão), utilizando o kit de diagnóstico de hs-CRP (: *high-sensitivity C Reactive Protein*) (Pars Azmun, Irã). A concentração de IL-6 foi determinada utilizando o método de ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) (kit Pelikine Compact IL-6 ELISA humano, CLB, Amsterdam, Holanda). De acordo com as instruções do fabricante.

## 5.10 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE HEPCIDINA

A concentração sérica de hepcidina foi determinada pelo método de ELISA, em duplicata, utilizando-se o kit comercial *Hepcidin Antimicrobial Peptide (HAMP)* (ELISA-Hepc®; CEB979Hu 96 Tests), que apresenta uma sensibilidade de 195,2pg/mL e limite de detecção de 493,8-40.000pg/mL.

## 5.11 EXTRAÇÃO DE DNA DE CMN-SP

A extração de DNA a partir de CMN-SP foi realizada utilizando um kit de extração por coluna NeoScience (One Lambda Inc., CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Cerca de 1 mL ( $1 \times 10^6$  células) de suspensão celular adicionada a microtubos de 1,5mL contendo 20µL de proteinase K 20U/L (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), para a lise inicial de proteínas. A quantificação do DNA foi realizada através de espectrofotometria (Nanodrop 2000c Spectrophotometer, Thermo Scientific, Wilmington, USA), e a integridade do DNA por gel de agarose (1,0%) contendo brometo de etídio. Após este procedimento as amostras de DNA foram mantidas refrigeradas em 20µL de TE (Tris/EDTA/NaCl) até o processamento da genotipagem. Para realizar a genotipagem, as amostras de DNA armazenadas, foram ressuspensas em 50 ul de TE e quantificadas por espectrofotometria em aparelho Nanodrôpio. Em seguida, as amostras de DNA foram diluídas em água ultrapura ficando na concentração final de 50ng/10uL.

## 5.12 GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS C.251A>G E C.212G>A DO GENE *HAMP*

A genotipagem dos polimorfismos do gene *HAMP*, c.251A>G e c.212G>A, foi realizada através da técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real, qPCR. Para o processamento foram utilizadas sondas VIC/FAM, do kit comercial TaqMan™ *SNP Genotyping Assays*, n° ID: C\_30975293\_10 para rs7251432 (c.251A>G), e n° ID: C\_29735973\_10 para rs104894696 (c.212G>A), e *TaqMan Mastermix Genotyping*, compatíveis com o equipamento 7500 FAST *Real-Time PCR system* (Applied Biosystems, CA, USA). De acordo com as instruções do fabricante é utilizado 5uL de *Mastermix*, 0,25 uL de sonda e cerca de 2-20ng/uL de DNA e água ultrapura para o volume final de 10 uL. As condições de amplificação das reações estão descritas na tabela 1. Esta técnica foi realizado no LIM31/FMUSP.

**Tabela 1. Condições de amplificação e genotipagem dos polimorfismos**

Etapas da reação (40 ciclos)	SNP c.251A>G (C_30975293_10)		SNP c.212G>A (C_29735973_10)	
	T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo
<b>Pré-PCR/Pós-PCR</b>	60	1 min	60	1 min
<b>Desnaturação inicial</b>	95	10 min	95	10 min
<b>Extensão</b>	95	15 seg	95	15 seg
<b>Hibridização</b>	60	1 min	60	1 min

T – Temperatura. Min – minutos; Seg – segundos. Fonte: A autora.

## 5.13 ANÁLISE DE DADOS

A análise estatística foi realizada após ser verificada a suposição de normalidade dos dados. Para dados, nos quais foi aceito a suposição de normalidade, utilizou-se testes paramétricos, quando este requisito de normalidade não foi aceito, utilizou-se dados não paramétricos. Para verificar a influência da hepcidina no metabolismo do ferro de indivíduos HIV-1, foi utilizado a análise de variância de uma via (ANOVA) com pós teste de *Tukey*.

A análise estatística da frequência dos genótipos foi realizada através do uso do teste de Qui-quadrado e do teste exato de Fisher. As análises de correlação foram realizadas por teste de *Pearlson*, no qual foi adotado o valor de r entre -1 e +1, para valor de r entre 0-0,25=correlação

fraca, para valor de  $r$  entre 0,25-0,5=correlação regular, para valor de  $r$  entre 0,5-0,75 moderada, para valor de  $r$  entre 0,75-1,0 correlação forte.

Para a elaboração do valor de referência de hepcidina, foram utilizados os percentis 2,5-97,5%, em que 95% da população estudada permaneceu. O nível de significância para todos os testes empregados foi de 5%.

Para fazer as análises de correlação e a influência dos analitos, foi dividido a população de estudo em quatro categorias. Soronegativo, indivíduos saudáveis, e para portadores de HIV-1, foi dividido em ART-naive (indivíduos que nunca fizeram uso de terapia antirretroviral), INNTR/INTR (inibidores não nucleosídeos da transcriptase reversa/inibidores nucleosídeos da transcriptase reversa), INTR/IP (inibidores nucleosídeos da transcriptase reversa/inibidor de protease). Foi aceito valor significativo quando  $p \leq 0,05$  na avaliação entre grupos e/ou no grupo. O programa estatístico utilizado foi a versão do SPSS 17.0 e 22.0 para *Windows*.

## 6.0 RESULTADOS

### 6.1 DESCRIÇÃO DAS AMOSTRA

Foram selecionados 299 indivíduos de ambos os gêneros, com idade entre 18 a 65 anos. Dentre esses, 199 indivíduos eram portadores do vírus HIV-1, sendo que desse grupo, 47 indivíduos eram pacientes ART-naive, ou seja, portadores do vírus que nunca fizeram uso de tratamento antirretroviral até a data de coleta das amostras.

Do restante, 54 indivíduos estavam em terapia antirretroviral baseado em INNTR/INTR, composta pelos medicamentos: efavirenz ou nevirapina, azidovudina e lamivudina. Sendo que 96 indivíduos estavam em terapia antirretroviral baseado em INTR/IP, composta pelos medicamentos: azidovudina, lamivudina e lopinavir/ritonavir

A mediana de idade dos indivíduos portadores de HIV-1 foi de  $41,8 \pm 11,1$  anos. Dos indivíduos soronegativos para HIV-1 a mediana foi de  $26,61 \pm 6,7$  anos. O índice de massa corpórea (IMC) foi de  $23,73 \pm 3,5$  para indivíduos HIV-1 e de  $20,67 \pm 1,5$  para indivíduos soronegativos.

Ocorreu um predomínio do gênero masculino em ambos os grupos, com 122 homens e 77 mulheres no grupo HIV-1. No grupo soronegativo para HIV-1, foi de 69 homens para 31 mulheres. Quanto a raça, 6 indivíduos declararam-se negros no grupo HIV-1 soropositivo, e 3 indivíduos no grupo HIV-1 soronegativo, os demais indivíduos declararam-se da raça branca.

### 6.2 MARCADORES DE INFECÇÃO DO HIV-1

O monitoramento da infecção HIV-1, é realizado através da contagem de linfócitos T-CD4+, T-CD8+ e da carga viral, que reflete a reação e o estado do sistema imunológico frente a infecção ocasionada pelo vírus, tabela 2. Neste estudo, a média da contagem de células T-CD4+ em indivíduos HIV-1 foi de  $464 \pm 248/\text{mm}^3$ . A distribuição não foi homogênea entre os grupos e dentro dos grupos.

O grupo ART-naive apresentou a menor quantidade de células T-CD4+, com uma média de  $412 \pm 194/\text{mm}^3$ , sendo significativo ( $p < 0,05$ ) quando comparado aos demais grupos. A contagem média de LT-CD8+ foi de  $1010 \pm 645/\text{mm}^3$  no grupo ART-naive, apresentando diferença significativa, quando comparado aos demais grupos. Essa diferença entre os grupos encontra-se bem estabelecida na literatura, uma vez que a



terapia antirretroviral visa a recuperação de células CD4+, e a diminuição de LT-CD8+.

Tabela 2. Comparação dos marcadores de infecção dos grupos avaliados (n = 299)

Parâmetros <sup>(1)</sup>	Soronegativo (n=100)	Indivíduos soropositivo HIV-1 (n=199)			Valor de <i>p</i> <sup>(2)</sup>
		ART - naive (n=47)	INNTR/INTR (n=56)	INTR/IP (n=96)	
<b>Marcadores de infecção</b>					
<b>LT-CD4<sup>+</sup>/ mm<sup>3</sup></b>	-	412±194	516±246	458±268	<0,05
<b>LT- CD8<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup></b>	-	1110±645	961±414	999±446	<0,05
<b>Razão CD4<sup>+</sup>: CD8<sup>+</sup></b>	-	0,5±0,3	0,6±0,3	0,5±0,3	>0,05
<b>HIV-1 cópias/ mL</b>	-	37776±76810	<50	<50	<0,05

INNTR/INTR = inibidor não nucleosídeo da transcriptase reversa/inibidor nucleosídeo da transcriptase reversa, INTR/IP= inibidor nucleosídeo da transcriptase reversa/inibidor de protease.

(1) Valores médios (± desvio padrão).

(2) Valor de *p*: comparação entre os quatro grupos estudados por ANOVA de uma via e pós-teste de *Tukey*

Fonte: A autora.

A carga viral (CV) do HIV-1 foi indetectável nos grupos com terapia baseada em INNTR/INTR e INTR/IP, ou seja, com o RNA mensageiro do HIV-1 estava inferior a 50 cópias/mL. Porém, no grupo ART-naive, a média de cópias virais foi de  $37776 \pm 76810$  cópias/mL. Este fato é atribuído a não utilização da HAART pelos indivíduos do grupo ART-naive, uma vez que um dos objetivos é a supressão completa da carga viral.

### 6.3 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

Alterações hematológicas são frequentes em indivíduos portadores de HIV/AIDS. Os resultados deste estudo demonstram que a média da contagem de eritrócitos no grupo INNTR/INTR foi  $3,9 \pm 0,5$  milhões de células. Este resultado é esperado, uma vez que esse grupo faz uso de azidovudina e esse medicamento apresenta efeito mielossupressor. Foi a menor média entre os três grupos portadores de HIV-1, apresentando valor significativo quando comparado com os demais grupos. A contagem de eritrócitos, dosagem de hemoglobina, e o hematócrito são parâmetros hematológicos necessários para diagnóstico de anemia.

Ao analisar a concentração de hemoglobina e o hematócrito dos grupos estudados percebemos que a média dos grupos foi de  $13,9 \pm 1,5$  g/dL para hemoglobina e  $40 \pm 25\%$  para o hematócrito, permanecendo dentro do intervalo de referência.

Os índices hematimétricos, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e amplitude de distribuição dos eritrócitos (RDW), são necessários para avaliar as características dos eritrócitos quanto ao tamanho, teor de hemoglobina e forma das hemácias. Esses índices não foram homogêneos quando comparados aos grupos. Os três grupos, apresentando valor significativo ( $p < 0,05$ ). A tabela 3 contém os parâmetros hematológicos realizados nos grupos de portadores de HIV-1.

Tabela 3. Comparação dos parâmetros hematológicos dos grupos HIV-1 (n=199)

Parâmetros hematológicos <sup>(1)</sup>	Soronegativo# (n=100)	Indivíduos soropositivo HIV-1 (n=199)			Valor de <i>p</i> <sup>(2)</sup>
		ART- naive (n=47)	INNTR/INTR (n=56)	INTR/IP (n=96)	
Eritrócitos (x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	-	4,6±0,5	3,9±0,5	4,2±0,5	<0,05
Hemoglobina (g/dL)	-	13,6±1,8	14,1±1,5	14,0±1,4	>0,05
VCM (fL)	-	89,0±9,3	105±8,0	99,4±9,5	<0,05
HCM (pg)	-	29,9±3,8	36,6±3,1	34,1±4,0	<0,05
CHCM(g/dL)	-	36,6±1,2	34,5±1,1	34,2±1,2	<0,05
RDW(%)	-	13,7±1,2	13,4±1,1	13,7±1,9	>0,05
Plaquetas (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	-	193±62	227±63	209±65	<0,05
VPM(fL)	-	12,8±12,4	10,2±0,7	10,6±0,9	<0,05

INNTR/INTR=inibidor não nucleosídeo da transcriptase reversa/inibidor nucleosídeo da transcriptase reversa, INTR/IP= inibidor nucleosídeo da transcriptase reversa/inibidor de protease; VCM=volume corpuscular médio; HCM=hemoglobina corpuscular média; CHCM= concentração de hemoglobina corpuscular média; RDW= amplitude de distribuição dos eritrócitos; VPM=volume plaquetar médio. #Parâmetros não realizados nesse grupo.

(1) Valores médios (± desvio padrão).

(2) valor de *p*: comparação entre os três grupos estudados por ANOVA de uma via pós-teste de *Tukey*

Fonte: A autora.

A quantidade média de plaquetas foi inferior no grupo ART-naive ( $193 \pm 62 \times 10^3/\text{mm}^3$ ) quando comparado aos demais grupos. Após a infecção pelo HIV-1, uma das primeiras alterações hematológicas é diminuição na contagem de plaquetas.

### **6.3.1 Leucograma**

O leucograma consiste na contagem diferencial das células do sangue periférico. As células que compõem um leucograma são neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos. Indivíduos portadores do vírus HIV-1 apresentam diminuição da contagem de leucócitos. Esse fato pode ser atribuído a infecção pelos vírus na medula óssea, a destruição das células LT-CD4+ pelo excesso de brotamento de partículas virais, ou devido ao tratamento com inibidores de protease, que apresentam como efeito adverso aplasia da medula, em casos severos, ou diminuição na produção de células.

**Tabela 4. Comparação do leucograma entre os grupos estudados**

Parâmetros <sup>(1)</sup>	Soronegativo#	Indivíduos soropositivo HIV-1 (n=199)			Valor de <i>p</i> <sup>(2)</sup>
		ART- naive (n=47)	INNTR/INTR (n=56)	INTR/IP (n=96)	
<b>Leucograma (%)</b>					
<b>Neutrófilos</b>	-	48,15±9,8	52,0±9,0	51,6±10,4	<0,05
<b>Linfócitos</b>	-	36,6±8,4	34,3±8,5	34,3±9,3	>0,05
<b>Monócitos</b>	-	10,7±2,1	9,6±2,2	9,9±2,8	<0,05
<b>Eosinófilos</b>	-	3,8±3,7	2,8±2,4	3,7±3,7	>0,05
<b>Basófilos</b>	-	0,5±0,2	0,5±0,2	0,5±0,3	>0,05

INNTR/INTR=inibidor não nucleosídeo da transcriptase reversa/inibidor nucleosídeo da transcriptase reversa, INTR/IP=inibidor nucleosídeo da transcriptase reversa/inibidor de protease. #Parâmetros não realizados nesse grupo.

(1) Valores médios ( $\pm$  desvio padrão).

(2) valor de *p*: comparação entre as médias dos grupos estudados por Teste T de *Student*

Fonte: A autora.

## 6.4 MARCADORES DO METABOLISMO DO FERRO

As concentrações de ferro e ferritina permaneceram constantes entre os três grupos portadores do HIV-1. O grupo ART-naive apresentou a menor concentração de ferro, dentre os três grupos, com uma média de  $75 \pm 27$   $\mu\text{g/dL}$ . Isso pode ser explicado pela replicação viral, na qual é necessário ferro para a geração de novas partículas virais. Alguns autores sugerem que a diminuição de ferro na infecção aguda está relacionada a depleção das células monocitárias e imunossupressão, diminuindo a disponibilidade de ferro ao meio extracelular (WISAKSANA et al., 2011; KOSALARAKSA et al., 2012).

Porém, os resultados obtidos no presente estudo demonstram que o número relativo de monócitos (10%) (tabela 4) é superior no grupo ART-naive, quando comparado aos demais grupos que não apresentam carga viral. O grupo INNTR/INTR e o grupo INTR/IP apresentaram uma média de  $82 \pm 35$   $\mu\text{g/dL}$  e  $88 \pm 40$   $\mu\text{g/dL}$  de ferro, respectivamente.

A concentração média de ferritina foi de  $138 \pm 136$   $\text{ng/dL}$  no grupo ART-naive,  $128 \pm 115$   $\text{ng/dL}$  no grupo INNTR/INTR e de  $142 \pm 147$   $\text{ng/dL}$  no grupo INTR/IP. A saturação de transferrina foi de  $24 \pm 13\%$  para o grupo ART-naive,  $24 \pm 10\%$  para o grupo INTR/INNTR e  $29 \pm 15\%$  para o grupo INTR/IP, apresentando um valor significativo quando comparamos o grupo INTR/IP com os demais grupos.

A concentração média de CTLF entre os três grupos foi de  $321 \pm 57$   $\mu\text{g/dL}$ , não apresentando diferença significativa entre os grupos. A tabela 5, a seguir descreve os parâmetros de ferro mensurados.

**Tabela 5. Comparação entre os marcadores de ferro dos grupos HIV-1**

Marcadores de ferro <sup>(1)</sup>	Soronegativo (n=100)	Indivíduos soropositivo HIV-1 (n=199)			Valor de <i>p</i> <sup>(2)</sup>
		ART-naive (n=47)	INNTR/INTR (n=56)	INTR/IP (n=96)	
<b>Ferro (µg/dL)</b>	82±37	75±27	82±35	88±40	<0,05
<b>Ferritina (ng/dL)</b>	118±75	138±136	128±115	142±147	<0,05
<b>Sat. Transferrina (%)</b>	25±12	24±13	24±10	29±15	<0,05
<b>CTLF (µg/dL)</b>	321±63	316±52	335±58	314±57	>0,05

INNTR/INTR = inibidor não nucleosídeo da transcriptase reversa/inibidor nucleosídeo da transcriptase reversa, INTR/IP = inibidor nucleosídeo da transcriptase reversa/inibidor de protease. Sat.= Saturação; CTLF = capacidade total de ligação ao ferro;

(1) Valores médios (± desvio padrão).

(2) valor de *p*: comparação entre os grupos estudados por ANOVA de uma via e pós- teste de *Tukey*

Fonte: A autora.



## 6.5 QUANTIFICAÇÃO DE INTERLEUCINA-6 E PROTEÍNA C REATIVA

A interleucina-6 e a proteína C reativas são preditores de inflamação. A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória que apresenta sua concentração elevada no início e no decorrer do desenvolvimento de doenças infecciosas crônicas. A proteína C reativa é considerada de fase aguda. Eleva-se inicialmente no processo infeccioso e inflamatórios, é um dos primeiros marcadores de inflamação que aparecem como marcador no sangue periférico. Ambas, IL-6 e PCR, estão envolvidas em vários processos de desenvolvimento de doenças relacionadas ao HIV/AIDS, a mortalidade, morbidade e no agravamento da anemia de doença crônica (HART et al., 2018; MASIÁ et al., 2017; GRUND et al., 2016). Foi realizado a dosagem de IL-6 e PCR em todos os grupos estudados, conforme ilustra a tabela 6, a seguir.

**Tabela 6. Dosagens dos marcadores inflamatórios**

Parâmetros <sup>(1)</sup>	Soronegativo (n=100)	Indivíduos soropositivo HIV-1 (n=199)			Valor de <i>p</i> <sup>(2)</sup>
		ART- naive (n=47)	INNTR/INTR (n=56)	INTR/IP (n=96)	
<b>Inflamação</b>					
<b>IL-6 (pg/mL)</b>	4,6±3,9	5,1±1,6	5,0±1,5	4,9±1,2	>0,05
<b>PCR (mg/L)</b>	1,6±0,9	4,0±0,8	2,1±0,8	2,0±1,0	<0,05

INNTR/INTR = inibidor não nucleosídeo da transcriptase reversa/inibidor nucleosídeo da transcriptase reversa, INTR/IP= inibidor nucleosídeo da transcriptase reversa/inibidor de protease.

IL-6 = Interleucina 6; PCR = Proteína C reativa

(1) Valores médios ( $\pm$  desvio padrão).

(2) valor de *p*: comparação entre os grupos estudados por ANOVA de uma via com pós teste de *Tukey*.

Fonte: A autora.

A concentração de IL-6 permaneceu similar entre os quatro grupos estudados, sem alterações. No entanto, a concentração sérica de PCR foi elevada apenas no grupo ART-naive, este resultado é justificado pela infecção aguda causada pelo vírus HIV-1.

## 6.6 QUANTIFICAÇÃO SÉRICA DE HEPCIDINA

A mensuração sérica de hepcidina foi realizada em todos os quatro grupos estudados. Após obter os valores de hepcidina dos indivíduos saudáveis (soronegativo) foi estabelecido um valor de referência para correlacionar com os valores obtidos dos demais grupos HIV-1 positivo. Um valor de referência é aquele em que 95% da população encontra-se. Para dados não paramétricos, o CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), recomenda que seja utilizado os percentis 2,5% a 97,5% para o intervalo de referência e a mediana para expressar o valor encontrado (OZARD, 2016).

A análise estatística demonstrou que a concentração de hepcidina não segue um valor normal dentro dos indivíduos selecionados para o estudo. Portanto, optou-se por utilizar a mediana, com valor de 235,50 µg/L e intervalo de referência entre 114—475 µg/L.

Em seguida, fez-se a divisão entre os gêneros de indivíduos soronegativo (saudáveis). Após a conclusão dos resultados, pode se observar que a mediana de hepcidina é similar entre as categorias de gênero masculino e feminino ( $p=0,347$ ). A tabela 7 ilustra a concentração de hepcidina e o intervalo utilizado.

Como não foi encontrado diferença entre as concentrações de hepcidina nos gêneros, as correlações e análise de média e mediana foram feitas com todos os indivíduos, independentes do gênero. As mesmas análises feitas para valor de referência em indivíduos saudáveis foram realizadas com indivíduos portadores de HIV-1. Em seguida, foi realizada uma comparação entre as medianas dos quatro grupos. Na tabela 8, a seguir, estão descritos os valores encontrados.

**Tabela 7. Concentração de hepcidina nos indivíduos saudáveis**

Parâmetro <sup>(1)</sup>	Indivíduos soronegativo HIV-1 (n=100)				Valor de $p^{(2)}$
	Gênero Masculino (n=69)		Gênero Feminino (n=31)		
	Mediana	Intervalo	Mediana	Intervalo	
<b>Hepcidina (µg/L)</b>	219,0	(112,0-474,5)	271,5	(114,0-475,0)	>0,05

(1) Valores mediana (intervalo 2,5%-97,5%)

(2) Valor de  $p$ : comparação entre os grupos estudados por Teste de *Kruskal-Wallis*.

Fonte: A autora.

**Tabela 8. Concentração de hepcidina nos grupos estudados**

Parâmetro <sup>(1)</sup>	Soronegativo (n=100)	Indivíduos soropositivo HIV-1 (n=199)			Valor de $p^{(2)}$
		ART-naive (n=47)	INNTR/INTR (n=56)	INTR/IP (n=96)	
<b>Hepcidina (µg/L)</b>	235,5 (114-477)	274 (128-409)	444 (124-580)	412 (185-548)	<0,05

INNTR/INTR=inibidor não nucleosídeo da transcriptase reversa/inibidor nucleosídeo da transcriptase reversa, INTR/IP= inibidor nucleosídeo da transcriptase reversa/inibidor de protease.

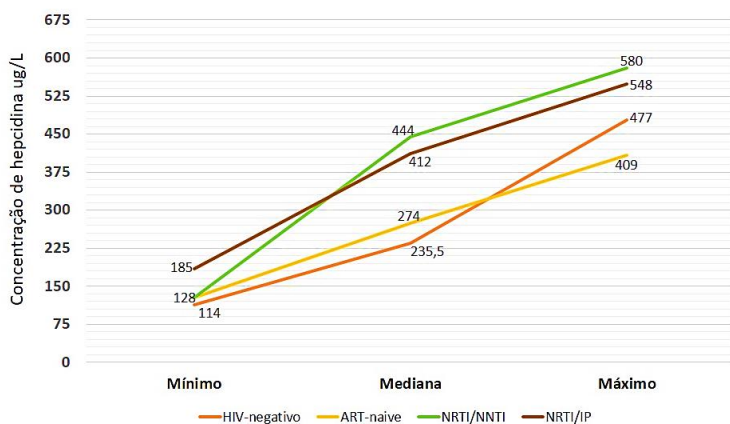
(1) Valores medianos (percentil 2,5-97,5%).

Valor de  $p$ : comparação entre os grupos estudados por Teste de *Kruskal-Wallis* e Teste de *Mann-Whitney U*.

Fonte: A autora.

As concentrações de hepcidina nos grupos em tratamento são similares, porém, elevadas quando comparadas ao grupo de indivíduos soronegativos para HIV-1 (saudáveis) e o grupo ART-naive. A comparação entre as medianas dos indivíduos soronegativo e os indivíduos pertencentes ao grupo ART-naive não apresentou resultado significativo ( $p>0,05$ ). Percebe-se que a concentração de hepcidina entre os indivíduos soronegativo e ART-naive, são similares e os intervalos de referência se sobrepõem (Figura 7).

**Figura 7. Intervalo dos valores de referência de hepcidina nos grupos estudados**



Nota-se que os grupos de HIV-negativo e ART-naive apresentam o mesmo intervalo de referência, o mesmo ocorre com os demais grupos em tratamento. No entanto, os indivíduos que fazem uso da TARV a concentração sérica de hepcidina é superior ao grupo ART-naive e soro negativo. Fonte: A autora.

Analisando a figura 7, podemos observar que todos os grupos apresentam valores mínimos de hepcidina acima de 100 µg/L, independente do estado patológico, portanto pode-se inferir que a concentração basal de hepcidina seja em torno de 100 µg/L.

Porém, é importante destacar que o número total de indivíduos analisados foi 299, e quando separamos por categorias, esse número torna-se inferior. Para fazer um valor de referência com um intervalo seguro, o ideal seria realiza-lo com uma quantidade de no mínimo 1000 indivíduos saudáveis, ou em uma quantidade máxima de indivíduos

saudáveis que represente uma população, uma vez que, cada organismo apresenta sua individualidade fisiológica própria (OZARDA et al., 2016).

A diferença entre as medianas dos grupos em terapia antirretroviral e o grupo de indivíduos saudáveis e ART-naive é quase o dobro. Vale ressaltar que, os principais achados de alterações hematológicas estão presentes nos grupos em tratamento crônico da doença. O aumento da concentração sérica de hepcidina, diminui a produção de eritrócitos e o grupo INNTR/INTR apresentou a menor média dos três grupos estudados na quantidade de eritrócitos quando comparados aos demais grupos.

### **6.6.1 Correlação entre hepcidina e os parâmetros analisados**

O apêndice A, apresenta a concentração de hepcidina nos grupos estudados e a correlação com os marcadores avaliados.

A maioria das correlações realizadas foi fraca a regular ( $r \leq 0,500$ ). Sendo importante destacar que no grupo ART-naive, a correlação entre a saturação de transferrina sérica foi de  $r=0,349$ ;  $p=0,016$ , porém não apresentou correlação com os demais marcadores do metabolismo do ferro. A correlação entre ferro e hepcidina foi de  $r=0,278$ ;  $p<0,05$ . Com a proteína C reativa a correlação foi  $r=0,316$ ;  $p=0,030$ , refletindo no estado inflamatório do grupo ART-naive.

A concentração sérica de hepcidina correlacionou-se com o marcador CD3+, marcador de linhagem linfocítica, bem como, com o número absoluto de linfócitos ( $r=0,313$ ;  $p=0,0420$ ) e com a quantidade relativa ( $r=0,404$ ;  $p<0,05$ ); esta é considerada uma correlação regular. A correlação entre a contagem absoluta e relativa de linfócitos T-CD4+ foi de  $r=0,280$ ;  $p=0,05$ ,  $r=0,206$ ;  $p=0,165$ , respectivamente. As correlações foram fracas, porém o número de indivíduos (47) do estudo é pequeno e interfere nas correlações e análises realizados. No entanto, essa correlação, mesmo fraca, deve ser levada em consideração, pois durante a infecção aguda pelo vírus HIV-1 a depleção de LT-CD4+ aumenta moderadamente, e conforme o sistema imune é ativado, a concentração sérica de hepcidina também vai aumentando.

As correlações entre hepcidina e LT-CD4+ não foram encontradas nos grupos em tratamento, uma vez que, o principal objetivo da TARV é a recuperação de LT-CD4+, ocorrendo apenas uma correlação fraca negativa com o marcador CD348+ ( $r= -0,228$ ;  $p<0,05$ ) e com a contagem relativa de linfócitos.

Outra correlação relacionada a série leucocitária encontrada, foi entre hepcidina e neutrófilos segmentados, esta correlação foi encontrada

nos três grupos portadores de HIV-1. A hepcidina correlacionou-se negativamente com o número de monócitos ( $r=-0,444$ ;  $p=0,001$ ) no grupo INNTR/INTR. Este, foi o único grupo que apresentou uma correlação entre hepcidina e a quantidade de plaquetas ( $r=0,293$ ;  $p=0,028$ ) e ferritina ( $r=-0,261$ ;  $p=0,06$ ).

## 6.7 GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS

Foi realizada a genotipagem dos polimorfismos c.251A>G e c.212G>A de 299 indivíduos, desses, 100 indivíduos soronegativo para HIV-1 e 199 indivíduos portadores do vírus HIV-1, porém, não foi possível realizar a técnica em 8 amostras de indivíduos HIV-1, ficando um total de 191 genotipagem em pacientes HIV-1. Na genotipagem da variante c.212G>A do gene *HAMP*, que confere um fator de risco para sobrecarga de ferro, foi encontrado em 100% das amostras o alelo G, não apresentando valor significativo ( $p>0,05$ ).

Na análise do polimorfismo c.251A>G foi observado um predomínio de heterozigotos, AG, em 95 indivíduos portadores de HIV-1, representando 49,7%. Em indivíduos soronegativos para HIV-1, 39 indivíduos apresentaram o genótipo heterozigoto AG, representando 39,0%. O genótipo AA foi predominante em indivíduos soronegativo para HIV-1, com 41% (41 indivíduos), quando comparado aos indivíduos soropositivo para HIV-1, com 19,4% (37 indivíduos). Para o genótipo homozigoto GG, houve um predomínio de 30,9% (59 indivíduos) em portadores de HIV-1, quando comparado aos indivíduos soronegativos, 20% (20 indivíduos). As tabelas 9 e 10 descrevem as frequências dos alelos nos grupos de estudos.

**Tabela 9. Distribuição dos genótipos entre indivíduos portadores de HIV-1 e indivíduos soronegativos (n=291)**

Variante c.251A>G	Soronegativo (n=100)	Indivíduos estudados		Valor de $p^{(1)}$
		Soropositivo HIV-1 (n=191)		
<b>Genótipo</b>				
<b>GG</b>	20 (20,0%)	59 (30,9%)		<0,05
<b>AG</b>	39 (39,0%)	95 (49,7%)		<0,05
<b>AA</b>	41 (41,0%)	37 (19,4%)		<0,05

(1) Valor de  $p < 0,05$  quando aplicado o teste *Qui-quadrado*.

Fonte: A autora.

**Tabela 10. Distribuição dos genótipos entre soronegativos, ART-naive, INNTR/INTR e INTR/IP (n=291)**

Variante c.251A>G	Soronegativo (n=100)	Indivíduos soropositivo HIV-1 (n=191)			Valor de $p^{(1)}$
		ART-naive (n=47)	INNTR/INTR (n=56)	INTR/IP (n=88)	
<b>Genótipo</b>					
<b>GG</b>	20 (20,0%)	9 (19,1%)	24 (42,9%)	26 (29,5%)	<0,05
<b>AG</b>	39 (39,0%)	22 (46,8%)	22 (39,3%)	51 (58,0%)	<0,05
<b>AA</b>	41 (41,0%)	16 (34,0%)	10 (17,9%)	11 (12,5%)	<0,05

(1) Valor de  $p < 0,05$  quando aplicado o teste *Qui-quadrado*.

Fonte: A autora.

### 6.7.1 Correlação entre o polimorfismo c.251A>G e concentração sérica de hepcidina

Para fazer a associação entre os genótipos do SNP c.251A>G e a concentração sérica de hepcidina, utilizou-se o valor de referência criado 235,5 (114—477)  $\mu\text{g/L}$ . O intervalo de referência foi utilizado para separar as concentrações séricas de hepcidina em baixa ( $\leq 160$   $\mu\text{g/L}$ ), média ( $>160 - \leq 320$   $\mu\text{g/L}$ ) e superior ( $>320$   $\mu\text{g/L}$ ), de acordo com os quartis. Na tabela abaixo está descrito os intervalos com os respectivos valores.

**Tabela 11. Concentração sérica de hepcidina dividido em baixo, médio e superior de acordo com o intervalo de referência estabelecido.**

Parâmetros	Intervalo de Referência			
	Soronegativo	Baixo	Médio	Superior
Hepcidina ( $\mu\text{g/L}$ )	235,5 (114 – 477)	$\leq 160$	$> 160 - \leq 320$	$> 320$

Após, foi realizado a correlação entre a concentração e os genótipos de acordo com a distribuição em cada grupo.



**Tabela 12. Frequência das concentrações de hepcidina de acordo com os alelos**

Parâmetro Hepcidina (µg/L)	Soronegativo (n=100)			Indivíduos soropositivo HIV-1 (n=191)									Valor de p <sup>(1)</sup>
				ART-naive (n=47)			INNTR/ INTR (n=56)			ITRN/IP (n=88)			
Intervalo	Baixo	Médio	Superior	Baixo	Médio	Superior	Baixo	Médio	Superior	Baixo	Médio	Superior	
<b>Genótipo</b>													
<b>GG</b>	4(20)	6(30)	10(50)	0(0)	7(79)	2(22)	1(4)	6(25)	17(71)	4(15,5)	4(15,5)	18(69)	<0,05
<b>AG</b>	14(36)	8(21)	17(43)	4(17)	16(70)	3(13)	0(0)	3(14)	19(86)	3 (6)	10(20)	38(74)	<0,05
<b>AA</b>	11(27)	10(24)	20(49)	1(6)	11(69)	4(25)	0(0)	0(0)	10(100)	0 (0)	0(0)	11(100)	<0,05

(%) Valor entre parênteses é a frequência em porcentagem (%) da concentração de hepcidina por alelo. (1) Valor de p <0,05 quando aplicado o teste de *Kruskall-Wallis*. Fonte: A autora.

A distribuição da concentração de hepcidina entre os alelos foi significativo quando aplicado o teste de *Kruskall-Wallis*. Analisando a tabela 12, podemos observar que as concentrações médias e superiores prevaleceram nos genótipos AG e AA. Nota-se que em indivíduos fazendo uso da terapia antirretroviral 100% das concentrações permaneceram elevadas no genótipo AA e manteve-se esse resultado para o genótipo AG, com as maiores frequências quando comparado aos demais.

É importante salientar que nos indivíduos portadores de HIV-1 a frequência do genótipo AG foi de 49,7% e para o genótipo AA, foi de 19,4% (Tabela 9), e a concentração sérica de hepcidina foi superior em indivíduos HIV-1 quando comparado aos indivíduos saudáveis.

## 6.8 INVESTIGAÇÃO DE ANEMIA

O critério para diagnóstico em adultos de anemia ferropênica utilizado foi o teor de hemoglobina, recomendado pela OMS (Organização Mundial da Saúde), em que para o gênero masculino utiliza-se o teor de hemoglobina inferior a 13g/dL, com hematócrito 39,0. Para o gênero feminino utiliza-se o teor de hemoglobina inferior a 12g/dL e hematócrito 36,0. A anemia é considerada de leve a moderada quando a concentração de hemoglobina permanecer na faixa de 12—7 g/dL, e grave caso esteja inferior a 6,9 g/dL. A hemoglobina apresenta baixa sensibilidade e especificidade, portanto é necessário fazer a análise da dosagem de ferritina e dos índices hematimétricos. A avaliação da concentração de ferro, saturação de transferrina e transferrina não são critérios obrigatórios, porém em nossa análise foram incluídos, bem como a concentração sérica de hepcidina (WHO, 2001).

A tabela a seguir (Tabela 13), descreve a média e desvio padrão dos indivíduos do gênero masculino que apresentaram hemoglobina igual ou inferior a 13g/dL e mulheres igual ou inferior a 12g/dL, juntamente com os demais parâmetros.

**Tabela 13. Indivíduos anêmicos**

Parâmetros	Indivíduos soropositivo HIV-1 (37)				Valor de $p^{(1)}$
	Gênero Feminino (9)		Gênero Masculino (28)		
	Média±DP	Mín.-Máx.	Média±DP	Mín.-Máx.	
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	11,1±0,8	9,2-11,9	11,9±0,7	10,5-12,9	>0,05
<b>VCM (fL)</b>	90,9±13,4	76,4-112	98±10,8	73,7-120,9	<0,05
<b>HCM (pg)</b>	30,2±5,6	24-38,4	32,7±4,1	22,2-40,1	<0,05
<b>CHCM (g/dL)</b>	33±1,0	31,7-34,5	33,25±1,2	30,2-35,6	>0,05
<b>RDW (%)</b>	15±2,0	12,9-19,6	14,5±2	12-19,8	>0,05
<b>Eritrócitos (<math>\times 10^6/\text{mm}^3</math>)</b>	3,7±0,5	2,84-4,61	3,66±0,4	2,82-4,86	<0,05
<b>Ferro (<math>\mu\text{g}/\text{dL}</math>)</b>	79,22±19	53-112	84,39±45	26-224	>0,05
<b>Ferritina (ng/dL)</b>	160,7±160	37-512	104,32±105,3	40-530	>0,05
<b>Sat. de transferrina (%)</b>	26±8,0	14-40	25,30±16	20-61	<0,05
<b>CTLF (<math>\mu\text{g}/\text{dL}</math>)</b>	311±75	242-499	330±51	244-488	<0,05
<b>Hepcidina (<math>\mu\text{g}/\text{L}</math>)</b>	322±141	144-332	353±142	120-599	>0,05
<b>Hematócrito (%)</b>	33,5±2,2	29-35,6	35,7±1,9	30,3-38,9	>0,05

Sat. = Saturação. VCM=volume corpuscular médio; HCM=hemoglobina corpuscular média; CHCM= concentração de hemoglobina corpuscular média; RDW= amplitude de distribuição dos eritrócitos; VPM=volume plaquetar médio; CTLF: capacidade total de ligação ao ferro.

(1) Valor de  $p$  para o Teste de *Kruskal-Wallis*.

Fonte: A autora.

A prevalência de anemia foi maior no gênero masculino (75,7%) quando comparada ao gênero feminino (24,3%). Treze indivíduos do gênero masculino apresentaram teor de hemoglobina entre 12g/dL e 10,5g/dL; e 8 indivíduos do gênero feminino, caracterizando anemia de leve a moderada. Apenas uma mulher pertencente ao grupo ART-naive apresentou teor de hemoglobina igual a 9 g/dL. Quinze (15) indivíduos do gênero masculino permaneceram na faixa de hemoglobina entre 13 g/dL a 12,1 g/dL, sendo caracterizado estado anêmico ou anemia leve. Dos 37 indivíduos anêmicos, 11 indivíduos pertenciam ao grupo ART-naive, 9 indivíduos ao grupo INNTR/INTR e 17 indivíduos pertenciam ao grupo INTR/IP. Nenhum indivíduo apresentou teor de hemoglobina inferior a 7 g/dL.

Um corte de ferritina inferior a 150 ng/dL, foi estabelecido para fazer distinção entre anemia ferropênica (<150 ng/dL) e anemia de inflamação (>150 ng/dL) com concentração de PCR superior a 8 mg/L (WHO, 2001). No entanto, nenhum indivíduo nesse estudo apresentou concentração de PCR > 8 mg/L. A concentração de ferritina, superior a 150 ng/dL foi observada em 6 indivíduos anêmicos, e nos demais, 31 indivíduos anêmicos, a concentração de ferritina foi inferior a 150 ng/dL. A anemia encontrada nesses indivíduos foi anemia ferropênica ou anemia por deficiência de ferro. De acordo com os critérios da OMS, não encontramos anemia de inflamação na população estudada.

A concentração sérica de hepcidina foi elevada em ambos os gêneros de indivíduos anêmicos. A concentração sérica de hepcidina em indivíduos anêmicos correlacionou-se negativamente com o número de LT-CD4+ ( $r=-0,218$ ;  $p<0,05$ ), número de eritrócitos ( $r= -0,312$ ;  $p<0,05$ ), e positivamente com o VCM ( $r=0,374$ ;  $p<0,05$ ), HCM ( $r=0,393$ ;  $p<0,05$ ), RDW ( $r=0,453$ ;  $p<0,05$ ). O número de LT-CD4+ correlacionou-se com a concentração sérica de ferro em indivíduos anêmicos ( $r=0,331$ ;  $p<0,05$ ) e com o teor de hemoglobina ( $r=0,332$ ;  $p<0,05$ ).

## 7.0 DISCUSSÃO

Desde a descrição da hepcidina e sua relação com o metabolismo do ferro e a imunidade inata, várias áreas da pesquisa clínica e laboratorial estão descrevendo sua importante ação no desenvolvimento de doenças infectocontagiosas. A primeira relação observada entre hepcidina e a infecção pelo vírus HIV-1 foi descrita por Xu et al., (2010). A influência da hepcidina no metabolismo do ferro e na eritropoiese tem ganhado grande importância em indivíduos acometidos pela Aids, principalmente no que se refere ao desenvolvimento de alterações hematológicas e anemias (MISETA et al., 2015).

Atualmente é difícil estabelecer um valor de referência para a concentração sérica de hepcidina, uma vez que existem vários métodos de dosagens. Amplamente utilizados, os métodos de espectrofotometria e de imunoensaios, apresentam divergências quanto as quantificações séricas de hepcidina. Havendo variações na sensibilidade e na especificidade de método para método, torna-se inviável a comparação de valores entre pesquisas. Outro aspecto que dificulta estabelecer um valor de referência para hepcidina é o N (número de indivíduos) discrepantes entre os trabalhos atuais. Geralmente, os trabalhos descritos, apresentam N entre 50 a 100 indivíduos, dentre os quais encontram-se o grupo de indivíduos clinicamente saudáveis e os indivíduos doentes. No entanto, dois grandes trabalhos estão sendo realizados, na Holanda (n= 2998) e na Itália (n=1577), a fim de estabelecer um valor de hepcidina e as variações referentes à concentração sérica (GIRELLI et al., 2016).

No presente trabalho, para realizar as correlações entre a concentração sérica de hepcidina e os parâmetros avaliados, foi criado um valor de referência a partir das amostras coletadas de indivíduos clinicamente saudáveis. O valor de referência para hepcidina foi de 235,50 µg/L com intervalo de 114—477 µg/L. Ao comparar o valor de referência deste trabalho com o valor de referência encontrado por Liu et al., (2014), que foi de 86,75 (78, 95—92,76) µg/L, percebemos que a concentração sérica de hepcidina na população brasileira selecionada para esta pesquisa é superior. Contudo, os valores de mediana para hepcidina deste estudo foram similares aos descritos por Quiros-Roldan et al., (2017) com 206 µg/L na população africana. A divergência entre os valores de mediana de hepcidina nos trabalhos pesquisados pode ser atribuído à diferença entre os métodos de análise, bem como à população de estudo, uma vez que, o ritmo circadiano influencia na concentração sérica de hepcidina, tanto quanto o gênero, idade avançada, estado

hormonal, nutrição, dentre outros fatores (LAINÉ et al., 2016; SIM et al., 2017).

Todavia, ao analisar a concentração sérica de hepcidina dos indivíduos portadores de HIV/AIDS, o grupo ART-naive apresentou a menor de todas as concentrações séricas 274 (128—409)  $\mu\text{g/L}$ , quando comparada com os demais grupos, INNTR/INTR com 444 (124—580)  $\mu\text{g/L}$  e INTR/IP com 412 (185—548)  $\mu\text{g/L}$ , ( $p < 0.005$ ). No entanto, o grupo ART-naive, foi o único grupo que apresentou PCR e IL-6 elevadas, sendo indicativos de inflamação. Sabe-se que a IL-6 é uma citocina indutora da síntese hepática de hepcidina através da via JAK/STAT, sendo esperado que nesse grupo a concentração sérica de hepcidina fosse encontrada aumentada (RAJA et al., 2005).

A menor concentração sérica de hepcidina no grupo ART-naive, pode ser atribuída ao estágio da inflamação e da infecção, posto que o aumento da concentração sérica de hepcidina é gradativo, ocorrendo aumento significativo no desenvolvimento da infecção à fase crônica da doença. Esse argumento é sustentado por meio dos resultados encontrados no estudo de coorte retrospectivo de Wisaksana et al. (2013), em que a concentração sérica de hepcidina em indivíduos infectados pelo vírus HIV-1 foi semelhante à concentração sérica de indivíduos saudáveis, e constatou-se que a progressão da doença aumenta a concentração sérica de hepcidina. Os autores alegaram que a inflamação crônica era o fator responsável pelo aumento de hepcidina sérica.

Cabe ressaltar que o aumento na concentração sérica de hepcidina encontrada neste trabalho, foi em indivíduos que fazem uso da HAART, e que os grupos INNTR/INTR e INTR/IP não apresentaram indícios laboratoriais de inflamação. No entanto foi dosado apenas PCR e IL-6, sendo que outros mediadores inflamatórios podem induzir a expressão de hepcidina hepática (ROSS et al., 2017). Outros trabalhos também apontam a utilização da HAART como um possível fator capaz de aumentar a concentração sérica de hepcidina, porém na literatura pesquisada não foi encontrado um estudo e/ou trabalho específico sobre o assunto. Sustenta-se essa hipótese, pois em várias situações a concentração sérica de hepcidina está elevada e não há aumento na concentração de citocinas inflamatórias (WISAKSANA et al., 2013; MALVOISIN et al., 2014). Os resultados encontrados nessa pesquisa, sustentam essa hipótese.

A concentração sérica de hepcidina correlacionou-se positivamente com a carga viral em indivíduos ART-naive ( $r=0,259$ ;  $p < 0,05$ ) e com o log do número de LT-CD4+ ( $r=0,372$ ;  $p < 0,05$ ). Acredita-

se que a hepcidina, bloqueia os estoques de ferro em células mononucleares para que ocorra a replicação viral e que dessa forma, influencia no agravamento das alterações hematológicas e anemias em indivíduos HIV-1 (KUMARI et al., 2016; XU et al., 2010). No entanto, a correlação entre hepcidina e a quantidade relativa de monócito nesse trabalho foi fraca ( $r= 0.149$ ). Porém, vale ressaltar que as principais células acometidas pelo HIV-1 são os LT-CD4+ e que a relação entre LT-CD4+/hepcidina deveria ser negativa. Seria esperado que na proporção que ocorre aumento de hepcidina sérica, o número de LT-CD4+ diminui, de tal forma que a correlação positiva entre hepcidina e LT-CD4+ é contraintuitiva.

Para justificar esse resultado, é necessário destacar duas questões relevantes: primeiramente relacionada ao tempo de diagnóstico dos indivíduos ART-naive, em que pode ter ocorrido antes da diminuição de LT-CD4+ parcial e/ou total. E o segundo ponto, relacionado ao sistema imunológico, que no início da infecção aumenta a produção de células linfóides. Essa correlação não foi encontrada nos demais grupos em tratamento, isso se deve a recuperação de células LT-CD4+ proporcionada pelo tratamento antirretroviral. Outros trabalhos, descrevem uma relação negativa entre LT-CD4+ e hepcidina (WISAKSANA et al., 2013). Contudo, a dosagem sérica de hepcidina foi realizada em indivíduos ART-naive em um período de 6 a 12 meses após a infecção e com sintomas evidentes de Aids, nessa população.

Nota-se uma correlação positiva entre a concentração sérica de hepcidina, ferro e saturação de transferrina, e uma correlação negativa com a concentração de ferritina em indivíduos pertencentes ao grupo ART-naive. Sendo que nos demais grupos estudados portadores de HIV-1, esta correlação não foi encontrada. O grupo INNTR/INTR apresentou uma correlação negativa na concentração de ferritina com hepcidina ( $r=-0,329$ ;  $p=0,06$ ). A menor concentração de ferro observada foi no grupo ART-naive, quando comparado aos demais grupos, (tabela 5) ( $p<0,05$ ).

Durante à infecção aguda ocorre aprisionamento de ferro e diminuição na mobilização dos estoques de ferritina através da ferroportina, a fim de impossibilitar a replicação de patógenos dependentes de ferro, justificando o aumento de ferritina no grupo ART-naive. Em decorrência da replicação viral do HIV-1 ser intracelular, a retenção de ferro pode ser considerado um “erro” da imunidade inata (CASSAT et al., 2013).

Atualmente, são poucos os trabalhos que relacionam a concentração sérica de hepcidina e o desenvolvimento da infecção pelo

HIV. De acordo com a análise de variância, tabela 3, a quantidade de eritrócitos em indivíduos HIV-1, no grupo ART-naive, apresenta-se normal. No entanto o VCM está reduzido, sendo indicativo de eritropoiese compensatória. A concentração média de hemoglobina é de  $13,6 \pm 1,8$  g/dL, permanecendo os valores no limite inferior (gênero feminino: Hb=12,5 g/L e gênero masculino: Hb=13,5 g/L). Esses resultados demonstram alterações iniciais na série vermelha. No grupo ART-naive a concentração sérica de hepcidina foi menor quando comparada aos demais indivíduos HIV-1, mesmo apresentando IL-6 e PCR aumentadas.

Em um estudo realizado em crianças africanas portadoras de HIV com anemia severa, residentes em uma região com elevada incidência de malária e doenças infecciosas generalizadas, a concentração de hepcidina foi baixa. No entanto, as crianças apresentaram estado clínico de inflamação. Os autores do estudo justificam esse resultado da seguinte forma; que sob condições de hipóxia relacionada à anemia severa e eritropoiese aumentada, os sinais inflamatórios associados à infecção, que geralmente aumentam a concentração de hepcidina podem ser anulados ou regulados de forma negativa (MUPFUDZE et al., 2015).

Os grupos que fazem uso da terapia antirretroviral (INNTR/INTR e INTR/IP) apresentaram concentrações séricas de hepcidina elevadas, como descrito anteriormente, bem como concentrações de ferritina elevadas (>150 ng/dL) e saturação de transferrina normal a reduzida ( $\leq 30\%$ ). Minchella et al. (2015), descreveram dois padrões distintos da correlação entre hepcidina e marcadores do metabolismo do ferro e da eritropoiese em indivíduos portadores do vírus HIV. O primeiro padrão está associado à inflamação (hepcidina-ferritina-saturação de transferrina) e o segundo padrão relacionado com a eritropoiese (ferro-saturação de transferrina- hemoglobina), no desenvolvimento da deficiência de ferro e da anemia. Embora ambos os padrões possam influenciar no desenvolvimento de anemia, os resultados obtidos pelos autores sugerem que o primeiro padrão apresenta maior importância para indivíduos HIV, uma vez que possibilita coinfeções no decorrer da Aids. A pesquisa realizada por Minchella et al., (2015) foi um estudo de coorte com 196 indivíduos ART-naive. Contudo, podemos observar que no presente trabalho os indivíduos em uso da TARV apresentaram o primeiro padrão, em que ferritina sérica, saturação de transferrina e hepcidina encontram-se elevadas em 42% dos portadores de HIV-1.

A relação hepcidina-ferro durante a infecção pelo vírus HIV-1 propicia o desenvolvimento de anemias adquiridas relacionadas ao



metabolismo do ferro. Neste estudo, 18,6% (37 indivíduos) apresentaram-se anêmicos. A anemia é um preditivo de morbidade e mortalidade na doença de Aids, uma vez que compromete a eritropoiese e altera os biomarcadores do metabolismo do ferro, bem como várias funções bioquímicas (JONKER et al., 2014; 2017).

A concentração de hepcidina foi elevada nos indivíduos com anemia ferropênica (Tabela 13). Os resultados obtidos corroboram com estudos anteriores (VISHNU et al., 2015; HUANG et al., 2016; BELPERIO et al., 2004). A hepcidina sérica em indivíduos anêmicos correlacionou-se negativamente com o número de eritrócitos, e positivamente com o VCM, HCM, RDW. Demonstrando a influência da hepcidina na eritropoiese e no desenvolvimento de anemia (KAUTZ et al., 2014). A concentração elevada de hepcidina altera a eritropoiese por suprimir o GDF-15 (*Growth differentiation factor 15*) (KIM et al., 2015).

A concentração de hepcidina correlacionou-se negativamente com o número de LT-CD4+, porém não encontramos uma correlação entre hepcidina e hemoglobina nos indivíduos anêmicos. No entanto, houve uma correlação positiva entre o número de LT-CD4+, a concentração de ferro e o teor de hemoglobina. Esses resultados também foram encontrados por Sicotte et al. (2015), em um estudo composto por 622 indivíduos portadores de HIV-1 com anemia.

Durante o estado anêmico, pode ser benéfica a redução de hepcidina para que ocorra a absorção e movimentação dos estoques de ferro (GANZ, 2006). Porém, essa redução pode alterar negativamente a competição de ferro entre patógeno e hospedeiro durante a infecção; sendo que na suplementação com ferro, no período de infecção ativa pelo HIV-1, o vírus sequestra o ferro com maior facilidade que a resposta imune inata, favorecendo seu ciclo replicativo e o desenvolvimento de doenças oportunistas (YANG et al., 2015; BRENTLINGER et al., 2016). Dessa forma, é necessário o controle da infecção, antes de intervenções farmacológicas à base de ferro para o tratamento da anemia ferropênica e deficiência de ferro em indivíduos HIV-1 (DRAKESMITH et al., 2012).

Lafferty et al. (2017) demonstraram que as  $\beta$ -defensinas apresentam atividade contra vírus envelopados. Considerando que a hepcidina é uma  $\beta$ -defensina, é possível que esta seja capaz de atuar na infecção pelo HIV-1. Isso pode explicar o aumento da concentração de hepcidina em indivíduos com carga viral suprimida, uma vez que a mesma não é inexistente, apenas indetectável pelos métodos tradicionais, bem como, a correlação entre hepcidina e células leucocitárias ( $r=0,362$ ;  $p<0,05$ ) em indivíduos fazendo uso da terapia antirretroviral. Estudos *in vitro* com

monócitos demonstraram que a infecção pelo vírus HIV-1 aumenta a expressão de  $\beta$ -defensinas; e que durante a infecção direta, o indutor potente de  $\beta$ -defensinas em respostas antivirais é o IFN- $\alpha$  (CORLEIS et al., 2017; PETROV et al., 2013). Porém, não foi dosado IFN- $\alpha$  neste estudo. Os resultados dessa pesquisa demonstram uma correlação negativa entre hepcidina e monócitos ( $r=-0,443$ ;  $p=0.001$ ) em indivíduos com carga viral suprimida. Durante a supressão viral, células LT-CD8+ com atividade antiviral continuam ativas, liberando granzinas e perforinas em células monocíticas infectadas pelo HIV-1, destruindo-as (RIBEIRO et al., 2014; SMITH et al., 2016). Se considerarmos que nessa situação a hepcidina atua como uma  $\beta$ -defensina, ela pode auxiliar na ativação de células LT-CD8+, para a destruição de monócitos. Portanto, enquanto ocorre aumento na concentração sérica de hepcidina, o número de monócitos diminuí.

Contudo, devemos considerar que as principais reservas de ferro estão em células mononucleares do sangue periférico, tanto em monócitos/macrófagos, quanto em linfócitos. Essas células possuem estoques de ferro (ferritina) e estão sujeitas à ação da hepcidina, impedindo a movimentação extracelular de ferro. As alterações na concentração de ferro sérico também podem afetar a proliferação e atividade de células T, e demais células na medula óssea (VANOICA et al., 2014; PILO et al., 2017).

Até então, a terapia antirretroviral não consegue restaurar a quantidade de células brancas, principalmente a linhagem linfóide, e este fato é atribuído em partes pela própria terapia medicamentosa, que pode apresentar efeito linfó e mielossupressor, e pela alteração do microambiente da medula pelo HIV-1, dificultando a diferenciação dos progenitores celulares (VISHNU et al., 2015). Porém, de acordo com os resultados deste trabalho podemos inferir que em concentrações elevadas, a hepcidina pode causar leucopenia ou interferir na diferenciação dos progenitores de células brancas. Esta hipótese pode ser sustentada pela correlação entre hepcidina e o número relativo e absoluto de neutrófilos, em que a correlação foi negativa, bem como pela quantidade de linfócitos, monócitos e de plaquetas (Apêndice A).

Alterações genéticas no gene *HAMP* podem influenciar no aumento ou na diminuição da concentração sérica de hepcidina, contribuindo para o desenvolvimento da hiperferremia ou hipoferremia (LESCANO et al., 2017; FARIA et al., 2016). A análise do polimorfismo c.251A>G do gene *HAMP*, neste trabalho, demonstrou um predomínio do genótipo heterozigoto, AG, em 95 indivíduos portadores de HIV-1,

representando 49,7%. Em indivíduos soronegativos para HIV-1, a frequência foi de 39,0% para o genótipo AG. O genótipo homozigoto AA prevaleceu em indivíduos soronegativos para HIV-1, com 41% (41 indivíduos), quando comparados aos indivíduos soropositivos para HIV-1, com 19,4% (37 indivíduos) (Tabelas 10 e 11).

A correlação entre os genótipos AA, AG e GG e a concentração sérica de hepcidina demonstrou um predomínio do genótipo AG quando a concentração de hepcidina manteve-se superior a 320 µg/L ( $p < 0,05$ ) (Tabela 13), tanto em indivíduos soronegativos quanto em indivíduos portadores do vírus HIV-1. Este é o primeiro trabalho que associa o polimorfismo c.251A>G e a concentração sérica de hepcidina. No entanto, é importante ressaltar que o aumento na concentração de hepcidina não foi exclusivo em indivíduos com alelo AA ou AG, sendo observado também em indivíduos que apresentam o alelo GG, porém em menor frequência.

Para confirmar este resultado, faz-se necessário a realização de um experimento de expressão *in vitro* com a sequência gênica das três variações do polimorfismo c.251A>G, afim de confirmar se os dados encontrados não foram ao acaso e se a concentração de hepcidina aumentada nesses indivíduos é referente ao polimorfismo ou decorrente do estado inflamatório e do processo infeccioso. Todavia, é importante ressaltar que nos grupos com genótipo AG e AA em que foi observado aumento na concentração sérica de hepcidina foram encontradas as principais alterações hematológicas e aumento de ferritina.

## 8. CONCLUSÃO

A influência da hepcidina no metabolismo do ferro em indivíduos HIV-1 foi verificada por meio de análises estatísticas dos resultados obtidos.

- O valor de referência estabelecido para a concentração sérica de hepcidina foi 235,5 (114-477) µg/L.
- O grupo ART-naive apresentou a menor concentração sérica de hepcidina, sendo este resultado atribuído ao estágio inicial da infecção.
- Os grupos INNTR/INTR e INTR/IP apresentaram as maiores concentrações de hepcidina sérica, sendo este resultado atribuído ao desenvolvimento da doença de Aids.
- A concentração sérica de proteína C reativa e interleucina 6 apresentaram-se elevadas apenas em indivíduos ART-naive, indicando inflamação.
- A concentração sérica de hepcidina correlacionou-se apenas com a concentração de proteína C reativa em indivíduos ART-naive. Essa correlação não foi encontrada nos demais grupos avaliados em que a concentração de hepcidina estava elevada, sugerindo que outros fatores contribuem para o aumento de hepcidina sérica.
- A análise de variância e o teste de correlação demonstraram a influência da concentração sérica de hepcidina na carga viral do vírus HIV-1 e em células LT-CD4+ de indivíduos ART-naive.
- A concentração sérica de hepcidina correlacionou-se com o número de eritrócitos, plaquetas e de células brancas do sangue periférico, confirmando sua influência no desenvolvimento dessas células, por meio da disponibilidade de ferro.
- Neste estudo, 18,6% dos indivíduos apresentaram anemia ferropênica moderada com concentrações elevadas de hepcidina sérica. Não foi encontrada anemia de doença crônica em indivíduos HIV-1.
- Em indivíduos anêmicos, a concentração sérica de hepcidina correlacionou-se negativamente com o número de LT-CD4+, número de eritrócitos e positivamente com o VCM, HCM, RDW.
- Não foi encontrada uma correlação entre o teor de hemoglobina e a concentração de hepcidina nos grupos avaliados.

- A análise do polimorfismo c.251A>G do gene *HAMP* demonstrou uma maior frequência do genótipo AG em indivíduos com concentração elevada de hepcidina.



## REFERÊNCIAS

- AGORO, R.; MURA, C. Inflammation-induced up-regulation of hepcidin and down-regulation of ferroportin transcription are dependent on macrophage polarization. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 61, p. 16–25, 2016.
- AHMED, A.; RAKSHIT, S.; VYAKARNAM, A. HIV-TB co-infection: Mechanisms that drive reactivation of Mycobacterium tuberculosis in HIV infection. **Oral Diseases**, v. 22, p. 53–60, 2016.
- ANDERSON, G. J.; FRAZER, D. M. Current understanding of iron homeostasis. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 106, p. 1559–1566, 2017.
- ANTAO, T. InterPopula: A Python API to access the HapMap Project dataset. **BMC Bioinformatics**, v. 11, n. 12, p. 1–6, 2010.
- AR, M. et al. Antihelminthics in helminth-endemic areas : effects on HIV disease progression (Review). **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 4, p. 1–59, 2016.
- ARMITAGE, A. E.; MORAN, E. HIV-associated tuberculosis: Does the iron-regulatory hormone hepcidin connect anemia with poor prognosis? **Journal of Infectious Diseases**, v. 213, n. 1, p. 3–5, 2016.
- ASIF, N. et al. Diagnostic accuracy of serum iron and total iron binding capacity (TIBC) in iron deficiency state. **Journal of the College and Surgeons Pakistan**, v. 26, n. 12, p. 958–961, 2016.
- AZEVEDO, C. G. et al. Binding of vanadium to human serum transferrin - voltammetric and spectrometric studies. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 180, n. 1, p. 211–221, 2018.
- BABITT, J. L. et al. Modulation of bone morphogenetic protein signaling *in vivo* regulates systemic iron balance. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 7, p. 1933–1939, 2007.
- BARBER AM, et al. HIV-1 reverse transcriptase: structure predictions for the polymerase domain. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v.6, n.9,1061-1072, 1990.

BEKRI S, et al. Increased adipose tissue expression of hepcidin in severe obesity is independent from diabetes and NASH.

**Gastroenterology**, v. 131, n. 3, p. 788-796, 2006.

BELPERIO PS, RHEW DC. Prevalence and outcomes of anemia in individuals with human immunodeficiency virus: a systematic review of the literature. **American Journal of Medicine**, v.116, n. 7, 27-43, 2004.

BRANNON, P. M.; TAYLOR, C. L. Iron supplementation during pregnancy and infancy: Uncertainties and implications for research and policy. **Nutrients**, v. 9, n. 12, p. 1–17, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos. Brasília, DF, 2017.

BRENTLINGER PE, et al. Practical Management of HIV-Associated Anemia in Resource-Limited Settings: Prospective Observational Evaluation of a New Mozambican Guideline. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v.32, n.1, p.12-25, 2016.

BRISSOT, P. et al. Genetic hemochromatosis: Pathophysiology, diagnostic and therapeutic management. **Presse Medicale**, v. 46, n. 12, p. 288–295, 2017.

BUCHANAN, C. C. et al. A comparison of cataloged variation between international HapMap consortium and 1000 genomes project data. **Journal of the American Medical Informatics Association**, v. 19, n. 2, p. 289–294, 2012.

BUTLER IF, et al. HIV genetic diversity: biological and public health consequences. **Current HIV Research**, v.5, n.1, 23-45, 2007.

CÁCERES, C. J. et al. Targeting deoxyhypusine hydroxylase activity impairs cap-independent translation initiation driven by the 5'untranslated region of the HIV-1, HTLV-1, and MMTV mRNAs. **Antiviral Research**, v. 134, n. 1, p. 192–206, 2016.

CAPPELLINI MD, et al. Iron deficiency across chronic inflammatory conditions: International expert opinion on definition, diagnosis, and management. **American Journal of Hematology**, v.92, n.10, p.1068-1078, 2017.



CAPRA, A. P. et al. A child with severe iron-deficiency anemia and a complex TMPRSS6 genotype. **Hematology**, v. 22, n. 9, p. 559–564, 2017.

CASANOVAS G. Bone morphogenetic protein (BMP)-responsive elements located in the proximal and distal hepcidin promoter are critical for its response to HJV/BMP/SMAD. **Journal of Molecular Medicine**, v.7, n.5, p.471-478, 2009.

CASSAT JE, SKAAR EP. Iron in infection and immunity. **Cell Host Microbe**, v. 13, n.5, p.509-519, 2013.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL (CDC). Update on acquired immune deficiency syndrome (AIDS)-United States. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 31, n.37, p.507-514, 1982.

CHEN, H. et al. Identification of zyklopen, a new member of the vertebrate multicopper ferroxidase family, and characterization in rodents and human cells. **The Journal of nutrition**, v. 140, n. 10, p. 1728–1735, 2010.

CHEN, Y. et al. Interaction of CARD14, SENP1 and VEGFA polymorphisms on susceptibility to high altitude polycythemia in the Han Chinese population at the Qinghai-Tibetan Plateau. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 57, p. 13–22, 2016.

CHENG PP, et al. Heparin expression in anemia of chronic disease and concomitant iron-deficiency anemia. **Clinical and Experimental Medicine**, v.11, n.1, p. 33-42, 2011.

CORLEIS B, ET AL. Early type I Interferon response induces upregulation of human  $\beta$ -defensin 1 during acute HIV-1 infection. **PLoS ONE**, v.12, n.3, p. 1-9, 2017

COSBY, C. Hematologic disorders associated with Human Immunodeficiency Virus and AIDS. **Journal of Infusion Nursing**, v. 30, n. 1, p. 22–32, 2007.

CUSTER, S. S. Management of coinfections in patients with Human Immunodeficiency Virus. **Nursing Clinics of North America**, v. 53, n. 1, p. 83–96, 2017.

D'ANGELO G. Role of hepcidin in the pathophysiology and diagnosis of anemia. **Blood Research**, v.48, n.1, p.10-15, 2013.

DE FALCO L, et al. Iron refractory iron deficiency anemia. **Haematologica**, v.98, n. 6, p. 845-853, 2013.

DEBEBE Z, et al. Iron chelators ICL670 and 311 inhibit HIV-1 transcription. **Virology**, v. 367, n. 2, p. 324-333, 2007.

DEBEBE Z, et al. Iron chelators of the di-2-pyridylketone thiosemicarbazone and 2-benzoylpyridine thiosemicarbazone series inhibit HIV-1 transcription: identification of novel cellular targets--iron, cyclin-dependent kinase (CDK) 2, and CDK9. **Molecular Pharmacology**, v. 79, n. 1, p. 185-196, 2011.

DRAKESMITH H, PRENTICE AM. Hepcidin and the iron-infection axis. **Science** n.338, p.768-72, 2012.

DRAKESMITH, H.; PRENTICE, A. Viral infection and iron metabolism. **Nature reviews. Microbiology**, v. 6, n. 7, p. 541-552, 2008.

EVSTATIEV R, GASCHÉ C. Iron sensing and signalling. **Gut**, v. 61, n. 6, p. 933-952, 2016.

FAIRWEATHER-TAIT, S. J. et al. The contribution of diet and genotype to iron status in women: A classical twin study. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. 1-4, 2013.

FARIA R, ET AL. Next-generation sequencing of hereditary hemochromatosis-related genes: Novel likely pathogenic variants found in the Portuguese population. **Blood Cells, Molecules and Diseases**. v.61:p.10-15. 2016.

FIBACH, E.; RACHMILEWITZ, E. A. Iron overload in hematological disorders. **Presse Medicale**, v. 46, n. 12, p. 296-305, 2017.

FLEMING RE. Hepcidin activation during inflammation: make it STAT. **Gastroenterology**, v. 132, n. 1, p. 447-449, 2007.

FLEMING, M. D. The regulation of hepcidin and its effects on systemic and cellular iron metabolism. **Hematology**, p. 151-158, 2008.

FRAENKEL PG. Anemia of inflammation: A review. **Medical Clinics of North America**, v.101, n.2, 285-296, 2017.

FRAENKEL PG. Understanding anemia of chronic disease. **Hematology**, v.2015, 14-18, 2015.

FRANKEL AD, YOUNG JA. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. **Annual Review of Biochemistry**, n.67, p.1-25,1998.

GANZ, T. Hepcidin and its role in regulating systemic iron metabolism. **Hematology**, p. 29–35, 2006.

GANZ T. Hepcidin and iron regulation, 10 years later. **Blood**, v. 117, n. 17, p. 4425-4433, 2011.

GEORGIU, N. et al. Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication in Human Mononuclear Blood Cells by the Iron Chelators Deferoxamine, Deferiprone, and Bleomycin. **The Journal Infectious Diseases**, v. 181, n. 2, p. 484–490, 2000.

GIRELLI D, NEMETH E, SWINKELS DW. Hepcidin in the diagnosis of iron disorders. **Blood**, v.127, n.23, p. 2809-2813, 2016.

GONG V. Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). **American Journal of Emergency Medicine**, v.2, n.4, p. 336-346,1984.

GORDEUK VR, et al. The association of serum ferritin and transferrin receptor concentrations with mortality in women with human immunodeficiency virus infection. **Haematologica**, v. 91, n. 6, p. 739-743, 2006.

GORDEUK, V. R. et al. Iron status and the outcome of HIV infection: An overview. **Journal of Clinical Virology**, v. 20, n. 3, p. 111–115, 2001.

GOZZELINO R, AROSIO P. Iron Homeostasis in Health and Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n.1, 2016.

GRUND, B. et al. Relevance of interleukin-6 and D-dimer for serious non-AIDS morbidity and death among HIV-positive adults on suppressive antiretroviral therapy. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, p. 1–16, 2016.

GULEC, A.; GULEC, S. Ankaferd influences mRNA expression of iron-regulated genes during iron-deficiency anemia. **Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis**, p. 1–5, 2017.

GULEC, S.; ANDERSON, G. J.; COLLINS, J. F. Mechanistic and regulatory aspects of intestinal iron absorption. **The American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 307, n. 4, p. 397–409, 2014.

HART, B. B. et al. Inflammation-Related Morbidity and Mortality Among HIV-Positive Adults: How Extensive Is It? **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 77, n. 1, p. 1–7, 2018.

HEENEY, M. M.; FINBERG, K. E. Iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA). **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 28, n. 4, p. 637–652, 2014.

HENTZE MW, et al. Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. **Cell**, v. 142, n. 1, p. 24-38, 2010.

HERINGTON, J. L. et al. Iron chelators ICL670 and 311 inhibit HIV-1 transcription. **Virology**, v. 367, n. 2, p. 324–333, 2007.

HO, J. et al. Pathological role and diagnostic value of endogenous host defense peptides in adult and neonatal sepsis: A systematic review. **Shock**, v. 47, n. 6, p. 673–679, 2017.

HOLLY, M. K.; DIAZ, K.; SMITH, J. G. Defensins in viral infection and pathogenesis. **Annual Review of Virology**, v. 4, n. 1, p. 369–391, 2017.

HOQUE, M. et al. Inhibition of HIV-1 gene expression by ciclopirox and deferiprone, drugs that prevent hypusination of eukaryotic initiation factor 5A. **Retrovirology**, v. 6, n. 90, p. 1–17, 2009.

HOQUE, M. et al. Regulation of gene expression by translation factor eIF5A: Hypusine-modified eIF5A enhances nonsense-mediated mRNA decay in human cells. **Translation**, v. 5, n. 2, p. 1–56, 2017.

HUANG YH, et al. Hepcidin-Induced Iron Deficiency Is Related to Transient Anemia and Hypoferremia in Kawasaki Disease Patients. **International Journal of Molecular Sciences**, v.17, n.5, p. 1-9, 2016.

HUANG YH, et al. Upstream stimulatory factor 2 is implicated in the progression of biliary atresia by regulation of hepcidin expression. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 43, n. 11, p. 2016-2023, 2008.

- HUANG, Y. H. et al. Correlation of HAMP gene polymorphisms and expression with the susceptibility and length of hospital stays in Taiwanese children with Kawasaki disease. **Oncotarget**, v. 8, n. 31, p. 51859–51868, 2017.
- JONKER FA, BOELE VAN HENSBROEK M. Anaemia, iron deficiency and susceptibility to infections. **Journal of Infection**, v. 69, n.1, p.23-27, 2014.
- JONKER FAM, et al. Anaemia, iron deficiency and susceptibility to infection in children in sub-Saharan Africa, guideline dilemmas. **British Journal of Haematology**. v.177,n.6, p. 878-883, 2017.
- KAISER, L. et al. Iron sufficient to cause hepatic fibrosis and ascites does not cause cardiac arrhythmias in the gerbil. **Translational Research**, v. 154, n. 4, p. 202–213, 2009.
- KAPLAN, J.; WARD, D. M.; DE DOMENICO, I. The molecular basis of iron overload disorders and iron-linked anemias. **International Journal of Hematology**, v. 93, n. 1, p. 14–20, 2011.
- KAUTZ L, et al. Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism. **Nature Genetic**, v.46, n.7, p.678-84, 2014.
- KAWABATA, H. The mechanisms of systemic iron homeostasis and etiology, diagnosis, and treatment of hereditary hemochromatosis. **International Journal of Hematology**, v. 107, n. 1, p. 31–43, 2017.
- KERKHOFF, A. D. et al. Anaemia in patients with HIV-associated TB: Relative contributions of anaemia of chronic disease and iron deficiency. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 20, n. 2, p. 193–201, 2016.
- KIM A, NEMETH E. New insights into iron regulation and erythropoiesis. **Current Opinion Hematology**. v.22, n.3, p. 199-205, 2015.
- KLEVEN, M. D.; JUE, S.; ENNS, C. A. The transferrin receptors, TfR1 and TfR2, bind transferrin through differing mechanisms. **Biochemistry**, p. A-H, 2018.
- KNUTSON MD, et al. Iron release from macrophages after erythrophagocytosis is up-regulated by ferroportin 1 overexpression and

down-regulated by hepcidin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. n. 102, v. 5, p. 1324-1328, 2005.

KOKA, P. S.; REDDY, S. T. Cytopenias in HIV infection: mechanisms and alleviation of hematopoietic inhibition. **Current HIV research**, v. 2, n. 3, p. 275–282, 2004.

KOSALARAKSA, P. et al. Prevalence of anemia and underlying iron status in naive antiretroviral therapy HIV-infected children with moderate immune suppression. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 28, n. 12, p. 1679–1686, 2012.

KOSKENKORVA-FRANK, T. S. et al. The complex interplay of iron metabolism, reactive oxygen species, and reactive nitrogen species: Insights into the potential of various iron therapies to induce oxidative and nitrosative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 65, p. 1174–1194, 2013.

KRAUSE A, et al. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. **FEBS Letters**, v. 480, n. 2-3, p.147-150, 2000.

KRISHNAMURTHY, P.; XIE, T.; SCHUETZ, J. D. The role of transporters in cellular heme and porphyrin homeostasis. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 114, n. 3, p. 345–358, 2007.

KÜHN, L. C. Iron regulatory proteins and their role in controlling iron metabolism. **Metalomics**, v. 7, n. 2, p. 232–243., 2015.

KULAKSIZ, H. et al. Pancreatic  $\beta$ -cells express hepcidin, an iron-uptake regulatory peptide. **Journal of Endocrinology**, v. 197, n. 2, p. 241–249, 2008.

KUMAR, A.; ABBAS, W.; HERBEIN, G. HIV-1 latency in monocytes/macrophages. **Viruses**, v. 6, n. 4, p. 1837–1860, 2014.

KUMARI, N. et al. Increased iron export by ferroportin induces restriction of HIV-1 infection in sickle cell disease by SAMHD1. **Blood Advances**, v. 1, n. 3, p. 170–183, 2016.

KWOK, P. Y. Approaches to allele frequency determination. **Pharmacogenomics**, v. 1, n. 2, p. 231–235, 2000.

LAFFERTY MK, et al. Human Beta Defensin 2 Selectively Inhibits HIV-1 in Highly Permissive CCR6<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T Cells. **Viruses**, v.9, n.5, p.111, 2017.

LAINÉ F, et al. Variations of hepcidin and iron-status parameters during the menstrual cycle in healthy women. **British Journal of Haematology**, v.175, n.5, 980-982. 2016.

LESCANO MA, TAVARES LC, SANTOS PCJL. Juvenile hemochromatosis: *HAMP* mutation and severe iron overload treated with phlebotomies and deferasirox. **World Journal Clinic Cases**, v. 5, n.10, p.381-383, 2017.

LI, G. et al. HIV-1 infection depletes human CD34+CD38-hematopoietic progenitor cells via pDC-dependent mechanisms. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 7, p. 1–20, 2017.

LIN, L. et al. Iron-transferrin regulates hepcidin synthesis in primary hepatocyte culture through hemojuvelin and BMP2/4. **Blood**, v. 110, n. 6, p. 2182–2189, 2007.

LIU Y, et al. Coinfection with HIV-1 alleviates iron accumulation in patients with chronic hepatitis C virus infection. **PLoS ONE**, v.9, n. 6, p. 1-9, 2014.

LIU, J. et al. Molecular pathogenesis of hereditary hemochromatosis. **Histology and Histopathology**, v. 31, n. 8, p. 833–840, 2016.

MACNEAL RJ, DINULOS JG. Acute retroviral syndrome, **Clinics in dermatology**, v. 24, n.4, 431-438, 2006.

MALINA, J.; HANNON, M. J.; BRABEC, V. Iron (II) supramolecular helicates interfere with the HIV-1 Tat-TAR RNA interaction critical for viral replication. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–6, 2016.

MALVOISIN E, MAKHLOUFI D, LIVROZET JM. Serum hepcidin levels in women infected with HIV-1 under antiviral therapy. **Journal of Medical Virology**, v.86, n.10, p.1656-1660, 2014.

MANCONE C, et al. Iron overload down-regulates the expression of the HIV-1 Rev cofactor eIF5A in infected T lymphocytes. **Proteome Science**, v.15, n.18, p. 1-10, 2017.

MASIÁ, M. et al. Contribution of Oxidative Stress to Non-AIDS Events in HIV-Infected Patients. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 75, n. 2, p. 36–44, 2017.

MBONYE, U. R. et al. Phosphorylation of CDK9 at Ser175 enhances HIV transcription and is a marker of activated P-TEFb in CD4+ T lymphocytes. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 5, p. 1–23, 2013.

MCDERMID JM, et al. Elevated iron status strongly predicts mortality in West African adults with HIV infection. **JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 46, n. 4, p. 498-507, 2007.

MERRYWEATHER-CLARKE AT, et al. Digenic inheritance of mutations in HAMP and HFE results in different types of haemochromatosis. **Human Molecular Genetics**, v. 12, n. 17, p. 2241-2247, 2003.

MILET, J. et al. Common variants in the BMP2 , BMP4 , and HJV genes of the hepcidin regulation pathway modulate HFE hemochromatosis penetrance. **American journal of human genetics**, v. 81, p. 799–807, 2007.

MINCHELLA PA, et al. Elevated Hepcidin Is Part of a Complex Relation That Links Mortality with Iron Homeostasis and Anemia in Men and Women with HIV Infection. **The Journal of Nutrition**, v.145, n.6, p. 1194-201, 2015.

MINCHELLA, P. A. et al. Elevated hepcidin at HIV diagnosis is associated with incident tuberculosis in a retrospective cohort study. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 18, n. 11, p. 1337–1339, 2014.

MIRÓ JM, et al. Clinical management of acute and chronic human immunodeficiency virus infection before starting antiretroviral treatment. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v.29, n.10, 759-772, 2011.

MISETA A, et al. Hepcidin and its potential clinical utility. **Cell Biology International**, v.39, n.11, 1191-202, 2015.

MIYAZAWA K, et al. Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signalling. **Genes Cells**, v. 7, n. 12, p. 1191-204, 2002.



MLECZKO-SANECKA K, et al. SMAD7 controls iron metabolism as a potent inhibitor of hepcidin expression. **Blood**, v. 115, n. 13, p. 2657-2665, 2010.

MOORE JP, TRKOLA A, DRAGIC T. Co-receptors for HIV-1 entry. **Current Opinion in Immunology**, v.9, n.4, 551-562, 1997.

MUÑOZ M, et al. Disorders of iron metabolism. Part 1: molecular basis of iron homeostasis. **Journal of Clinical Pathology**, v. 64, n. 4, p. 281-286, 2011.

MUPFUDZE TG, et al. Plasma Concentrations of Hepcidin in Anemic Zimbabwean Infants. **PLoS ONE**.v.10, n.8, p.1-7, 2015.

NAIRZ M et al. Iron deficiency or anemia of inflammation? Differential diagnosis and mechanisms of anemia of inflammation. **Wiener Medizinische Wochenschrift**, v. 166, n.13, 411-423, 2016.

NASI, A.; CHIODI, F. Mechanisms regulating expansion of CD8+ T cells during HIV-1 infection. **Journal of Internal Medicine**, p. 1-11, 2018.

NEKHAI, S.; KUMARI, N.; DHAWAN, S. Role of cellular iron and oxygen in the regulation of HIV-1 infection. **Future Virology**, v. 8, n. 3, p. 301-311, 2013.

NEMETH E, et al. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. **Science**, v. 306 n. 5704, p. 2090-2093, 2004.

NEMETH E, GANZ T. Anemia of inflammation. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v.28, n.4, p. 671-81, 2014.

NEMETH E, GANZ T. The role of hepcidin in iron metabolism. **Acta Haematologica**, v. 122 n. 2-3, p. 78-86, 2009.

NEMETH, E. et al. The N-terminus of hepcidin is essential for its interaction with ferroportin: Structure-function study. **Blood**, v. 107, n. 1, p. 328-333, 2006.

- NICOLAS G, et al. Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 7, p. 4596-4601, 2002.
- ORIGASSA, C. S. T.; CÂMARA, N. O. S. Cytoprotective role of heme oxygenase-1 and heme degradation derived end products in liver injury. **World Journal of Hepatology**, v. 27, n. 5, p. 541–549, 2013.
- OTITI-SENGERI, J. et al. Elevated inflammatory cytokines in aqueous cytokine profile in HIV-1 infected patients with cataracts in Uganda. **BMC Ophthalmology**, v. 18, n. 12, p. 1–8, 2018.
- OZARDA, Y. Reference intervals: Current status, recent developments and future considerations. **Biochemia Medica**, v. 26, n. 1, p. 5–16, 2016.
- PAK M, et al. Suppression of hepcidin during anemia requires erythropoietic activity. **Blood**, v. 108, n. 12, p. 3730-3735, 2006.
- PAPARIDIS, N. F. DOS S.; DURVALE, M. C.; CANDURI, F. The emerging picture of CDK9/P-TEFb: more than 20 years of advances since PITALRE. **Molecular Biosystems**, v. 13, n. 2, p. 246–276, 2016.
- PARK CH, et al. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276 n. 11, p.7806-7810, 2001.
- PASCUTTI, M. F.; ERKELENS, M. N.; NOLTE, M. A. Impact of viral infections on hematopoiesis: From beneficial to detrimental effects on bone marrow output. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. 364, p. 1–12, 2016.
- PETROV V, ET AL. Human  $\beta$  defensin-3 induces chemokines from monocytes and macrophages: diminished activity in cells from HIV-infected persons. **Immunology**, v.140, n.4, 413-420, 2013.
- PIETRANGELO A, et al. STAT3 is required for IL-6-gp130-dependent activation of hepcidin *in vivo*. **Gastroenterology**, v. 132, n. 1, p. 294-300, 2007.

PIETRANGELO, A. Genetics, Genetic Testing, and Management of Hemochromatosis: 15 Years since Heparin. **Gastroenterology**, v. 149, n. 5, p. 1240–1251e4, 2015.

PIGEON C, et al. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. **The Journal of Biological Chemistry** v. 276, n. 11, p. 7811-7819, 2001.

PILO F, ANGELUCCI E. A storm in the niche: Iron, oxidative stress and haemopoiesis. **Blood Reviews**. pii: S0268-960X, n.17, p.30043-30047, 2017.

PINTO, J. et al. Iron Refractory Iron Deficiency Anemia in Dizygotic Twins Due to a Novel Tmprss6 Gene Mutation in Addition to Polymorphisms Associated With High Susceptibility to Develop Ferropenic Anemia. **Journal of Investigative Medicine High Impact Case Reports**, v. 5, n. 2, p. 1–4, 2017.

PIPERNO, A., et al. Modulation of hepcidin production during hypoxia-induced erythropoiesis in humans in vivo: data from the HIGHCARE project. **Blood**, v. 117, n.10, p. 2953-2959, 2011.

QUIROS-ROLDAN E, et al. The impact of antiretroviral therapy on iron homeostasis and inflammation markers in HIV-infected patients with mild anemia. **Journal of Translational Medicine**, v.15, n.1, p. 256, 2017.

RAJA KB, et al. Role of interleukin-6 in hypoxic regulation of intestinal iron absorption. **British Journal of Haematology**, v.131, n.5, p.656-662, 2005.

RAMOS E, et al. Evidence for distinct pathways of hepcidin regulation by acute and chronic iron loading in mice. **Hepatology**, v. 53, n. 4, 1333-1341, 2011.

RAWAT R, et al. Elevated iron stores are associated with HIV disease severity and mortality among postpartum women in Zimbabwe. **Public Health Nutrition**, v. 12, n. 9, p. 1321-1329, 2009.

RAWLINGS JS, et al. The JAK/STAT signaling pathway. **Journal of Cell Science**, v. 117, n. 8, p. 1281-1283, 2004.

- REICHERT, C.O., et al. Influence of hepcidin in the development of anemia, In: KHAN, J. **Current Topics in Anemia**. 1 ed. Croácia: InTech, 2018. p. 217-231.
- REICHERT, C.O., et al. Heparin: homeostasis and diseases related to iron metabolism. **Acta Haematologica**, v. 137, n. 4, p. 220-236, 2017.
- PMID: 28514781. RIBEIRO, S. P. et al. The CD8+ memory stem T cell (TSCM) subset is associated with improved prognosis in chronic HIV-1 infection. **Journal of Virology**, v. 88, n. 23, p. 13836–13844, 2014.
- ROBBINS AND COTRAN. Pathologic Basis of Disease. **Elsevier Saunders**, 7 edição, p.247, 2004.
- ROSS AC. Impact of chronic and acute inflammation on extra- and intracellular iron homeostasis. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.106, n.6, p.1581-1587, 2017.
- SACHDEVA, R. et al. DING proteins from phylogenetically different species share high degrees of sequence and structure homology and block transcription of HIV-1 LTR promoter. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. 1–9, 2013.
- SAL, E. et al. Iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA) cases with 2 novel TMPRSS6 mutations. **Pediatric Hematology and Oncology**, v. 33, n. 3, p. 226–232, 2016.
- SANVISENS, N. et al. Regulation of ribonucleotide reductase in response to iron deficiency. **Molecular Cell**, v. 44, n. 5, p. 759–769, 2011.
- SANVISENS, N. et al. Yeast dun1 kinase regulates ribonucleotide reductase small subunit localization in response to iron deficiency. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 18, p. 9807–9817, 2016.
- SAUER, S. Typing of single nucleotide polymorphisms by MALDI mass spectrometry: Principles and diagnostic applications. **Clinica Chimica Acta**, v. 363, n. 1–2, p. 95–105, 2006.
- SHANKARAN, P. et al. Effects of heme degradation products on reactivation of latent HIV-1. **Acta Virologica**, v. 61, n. 1, p. 86–96, 2017.

SHI, X. et al. Neutropenia during HIV infection: Adverse consequences and remedies. **International Reviews of Immunology**, v. 33, n. 6, p. 511–536, 2016.

SICOTTE M, et al. Nutritional status of HIV-infected patients during the first year HAART in two West African cohorts. **Journal of Health, Population, and Nutrition**, v.34, n.1,p. 1-10, 2015.

SILICIANO RF, GREENE WC. HIV latency. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**. v.1, n.1, p. 1-9, 2011.

SILVA, B. et al. The hepcidin gene promoter nc.-1010C > T; -582A > G haplotype modulates serum ferritin in individuals carrying the common H63D mutation in HFE gene. **Annals of Hematology**, v. 93, n. 12, p. 2063–2066, 2014.

SIM M, et al. Interleukin-6 and Hepcidin Levels during Hormone-Deplete and Hormone-Replete Phases of an Oral Contraceptive Cycle: A Pilot Study. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v.70, n.2, p.100-105, 2017.

SMITH KN, et al. Effective Cytotoxic T Lymphocyte Targeting of Persistent HIV-1 during Antiretroviral Therapy Requires Priming of Naive CD8+ T Cells. **MBio**, v. 7, n.3, p. 1-10, 2016.

SOE-LIN S, et al. Nramp1 promotes efficient macrophage recycling of iron following erythrophagocytosis in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 14, p. 5960-5965, 2009.

SOW FB, et al. Expression and localization of hepcidin in macrophages: a role in host defense against tuberculosis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 82, n. 4, p. 934-945, 2007.

STROUD, J. C. et al. Structural basis of HIV-1 activation by NF-kappaB - a higher-order complex of p50: RelA bound to the HIV-1 LTR. **Journal of Molecular Biology**, v. 393, n. 1, p. 98–112, 2009.

SULLIVAN PS, et al. Epidemiology of anemia in human immunodeficiency virus (HIV)-infected persons: results from the multistate adult and adolescent spectrum of HIV disease surveillance project. **Blood**, v.91, n.1, p.301-308, 1998.

- TAREMWA, I. M. et al. Prevalence of HIV-related thrombocytopenia among clients at Mbarara Regional Referral Hospital, Mbarara, southwestern Uganda. **Journal of Blood Medicine**, v. 6, p. 109–113, 2015.
- TRAORÉ HN, MEYER D. The effect of iron overload on in vitro HIV-1 infection. **Journal of Clinical Virology**, v. 31, p. S92-8, 2004.
- UNAIDS. UnAids data 2017. Suíça, Genebra, 2017.
- VALORE, E. V.; GANZ, T. Posttranslational processing of hepcidin in human hepatocytes is mediated by the prohormone convertase furin. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 40, n. 1, p. 132–138, 2008.
- VAN LINT C, BOUCHAT S, MARCELLO A. HIV-1 transcription and latency: an update. **Retrovirology**, v.26, n.10, 67,2013.
- VANOAICA L, et al. Conditional deletion of ferritin h in mice reduces B and T lymphocyte populations. **PLoS ONE**, v.21, n.9, e89270, 2014.
- VASHCHENKO G, MACGILLIVRAY RT. Multi-copper oxidases and human iron metabolism. **Nutrients**, v. 5, n. 7, p. 2289-2313, 2013.
- VIGANO, S. et al. Prolonged antiretroviral therapy preserves HIV-1-specific CD8 T cells with stem cell-like properties. **Journal of Virology**, v. 89, n. 15, p. 7829–7840, 2015.
- VISHNU P, ABOULAFIA DM. Haematological manifestations of human immunodeficiency virus infection. **British Journal of Haematology**, v.171, n.5, 695-709, 2015.
- WANG J, PANTOPOULOS K. Regulation of cellular iron metabolism. **Biochemical Journal**, v. 434, n. 3, p. 365-381, 2011.
- WANG, C. et al. Reciprocal regulation between hepcidin and erythropoiesis and its therapeutic application in erythroid disorders. **Experimental Hematology**, v. 52, p. 24–31, 2017.
- WILSON, S. S.; WIENS, M. E.; SMITH, J. G. Antiviral mechanisms of human defensins. **Journal of Molecular Biology**, v. 425, n. 24, p. 4965–4980, 2013.
- WISAKSANA R, et al. Inverse Relationship of Serum Hepcidin Levels with CD4 Cell Counts in HIV-Infected Patients Selected from an

Indonesian Prospective Cohort Study. **PLoS ONE**, v.8, n.11, p. 1-9, 2013.

WISAKSANA, R. et al. Anemia and iron homeostasis in a cohort of HIV- infected patients in Indonesia. **BMC Infectious Diseases**, v. 11, n. 213, p. 1–10, 2011.

WISAKSANA, R. et al. Inverse relationship of serum hepcidin levels with CD4 cell counts in HIV-infected patients selected from an Indonesian prospective cohort study. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. 1–8, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, WHO/UNICEF/UNU. Iron deficiency anemia: assessment, prevention and control: a guide for programme managers. Geneva (Switzerland): WHO; p.144, 2001.

XU M, et al. Hpcidin induces HIV-1 transcription inhibited by ferroportin. **Retrovirology**, v. 2, n. 7, p. 104, 2010.

YANG, G. et al. Defective iron homeostasis in human immunodeficiency virus type-1 latency. **Current Trends Immunology**, v. 17, p. 125–131, 2015.

ZHANG, W. E. N. Q. I. A. N. et al. Comparing genetic variants detected in the 1000 genomes project with SNPs determined by the International HapMap Consortium. **Journal of Genetics**, v. 94, n. 4, p. 731–740, 2015.

## APÊNDICE A - Correlação entre hepcidina e os parâmetros analisados no estudo (continua)

Indivíduos soropositivo HIV-1 (n=199)									
Parâmetros <sup>(1)</sup>	ART-naïve (n=47)	Valor de P	Correlação	INNTR/INTR (n=56)	Valor de P	Correlação	IIRN/IP (n=96)	Valor de P	Correlação
<b>Hepcidina (µg/L)</b>	235,5 (114—477)			444 (124—580)			412 (124—580)		
<b>Ferro (µg/dL)</b>	75±27	<0,05	0,278	82±35	>0,05	-0,093	88±40	>0,05	0,055
<b>Ferritina (ng/dL)</b>	138±136	>0,05	-0,152	128±115	0,06	-0,329	142±147	>0,05	-0,23
<b>Saturação de transferrina (%)</b>	24±13	<0,05	0,349	24±10	>0,05	-0,044	29±15	>0,05	0,65
<b>CTLF (µg/dL)</b>	316±52	>0,05	0,82	335±58	>0,05	-0,056	314±57	>0,05	-0,7
<b>Eritrócitos (x10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup>)</b>	4,6±0,5	>0,05	0,142	3,9±0,5	>0,05	0,14	4,2±0,5	>0,05	0,053
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	13,6±1,8	>0,05	0,242	14,1±1,5	>0,05	-0,47	14±1,4	>0,05	0,117
<b>VCM (fL)</b>	89,0±9,3	>0,05	0,045	105±8,0	>0,05	0,004	99,4±9,5	>0,05	-0,81
<b>HCM (pg)</b>	29,9±3,8	>0,05	0,047	36,6±3,1	>0,05	-0,063	34,1±4,0	>0,05	-0,085
<b>CHCM (g/dL)</b>	36,6±1,2	<0,05	0,258	34,5±1,1	>0,05	-0,0171	34,2±1,2	>0,05	-0,032
<b>RDW (%)</b>	13,7±1,2	>0,05	0,191	13,4±1,1	0,069	0,245	13,7±1,9	>0,05	0,136
<b>Plaquetas (x10<sup>3</sup> mm<sup>3</sup>)</b>	193±62	<0,05	0,136	227±63	0,028	0,293	209±65	0,068	0,186
<b>VPM (fL)</b>	12,8±12,4	>0,05	0,134	10,2±0,7	>0,05	0,129	10,6±0,9	>0,05	0,12
<b>Hematócrito (%)</b>	40±4,5	>0,05	0,162	40±3,6	>0,05	0,005	40±3,8	>0,05	0,062
<b>IL-6 (pg/mL)</b>	5,1±1,6	>0,05	0,44	5,0±1,5	>0,05	0,061	4,9±1,2	>0,05	0,047
<b>PCR (µg/mL)</b>	4,0±0,8*	<0,05	0,316	2,1±0,8	0,09	-0,348	2,0±1,0	<0,05	0,21
<b>Número de Leucócitos/mm<sup>3</sup></b>	5575±1595	>0,05	0,87	6157±1679	0,05	0,362	6110±2010	>0,05	0,124
<b>Segmentados (%)</b>	48,15±9,8	<0,05	-0,301	52±9,0	>0,05	-0,186	51,6±10,4	<0,05	-0,331
<b>Segmentados (mm<sup>3</sup>)</b>	2692±1010	>0,05	-0,071	3320±1197	0,05	-0,379	3226±1544	<0,05	-0,215
<b>Linfócitos (%)</b>	36,6±8,4	<0,05	0,404	34,3±8,5	0,067	-0,246	34,4±9,3	<0,05	-0,31
<b>Linfócitos (mm<sup>3</sup>)</b>	2030,5±704	<0,05	0,313	2090±643	>0,05	-0,1	2042±740	>0,05	-0,092
<b>Monócitos (%)</b>	10,7±2,1	>0,05	0,149	9,6±2,2	>0,05	-0,215	9,9±2,8	>0,05	-0,25
<b>Monócitos (mm<sup>3</sup>)</b>	589,8±187	>0,05	0,159	575,7±184	0,001	-0,443	577±199	>0,05	-0,55



## APÊNDICE A - Correlação entre hepcidina e os parâmetros analisados no estudo (conclusão)

Indivíduos soropositivo HIV-1 (n=199)									
Parâmetros <sup>(1)</sup>	ART-naïve (n=47)	Valor de P	Correlação	INNTR/INTR (n=56)	Valor de P	Correlação	ITRN/IP (n=96)	Valor de P	Correlação
Eosinófilos (%)	3,8±3,7	>0,05	-0,12	2,8±2,4	>0,05	-0,064	3,7±3,7	>0,05	-0,112
Eosinófilos (mm <sup>3</sup> )	213,7±205	>0,05	-0,65	177,6±162	>0,05	-0,201	221±267	>0,05	-0,61
Basófilos (%)	0,5±0,2	>0,05	0,145	0,5±0,2	>0,05	-0,09	0,5±0,3	>0,05	-0,117
Basófilos (mm <sup>3</sup> )	34,6±60,2	>0,05	0,146	29,4±18	>0,05	-0,061	27,3±17	>0,05	-0,69
LT-CD4 <sup>+</sup> (mm <sup>3</sup> )	412±194	<0,05	0,28	516±246	>0,05	-0,139	458±268	>0,05	0,068
LT-CD4 <sup>+</sup> (%)	21,7±9,7	>0,05	0,206	24,4±8	>0,05	-0,06	31,6±9	>0,05	0,093
LT-CD8 <sup>+</sup> (mm <sup>3</sup> )	1110±645	>0,05	0,166	961±414	>0,05	0,032	999±446	>0,05	-0,8
LT-CD8 <sup>+</sup> (%)	228,4±1170	>0,05	-0,116	44,5±10	>0,05	-0,183	50,1±13	>0,05	-0,105
CD4 <sup>+</sup> :CD8 <sup>+</sup> razão	0,5±0,3	>0,05	0,034	0,6±0,3	>0,05	-0,042	0,5±0,3	>0,05	0,145
Carga viral (cópias/mL)	37776±76810	<0,05	0,259	<50	-	-	<50	-	-
Log T-CD4 <sup>+</sup> (%)	1,3±0,3	<0,05	0,362	1,4±0,1	>0,05	-0,059	1,3±0,1	>0,05	-0,019
Log T-CD4 (mm <sup>3</sup> )	2,5±0,5	<0,05	0,372	2,8±0,1	>0,05	-0,188	3,1±0,3	>0,05	-0,149
Log T-CD8 (%)	1,7±0,3	>0,05	0,207	1,6±0,1	>0,05	-0,01	1,6±0,1	>0,05	-0,144
Log T-CD8 (mm <sup>3</sup> )	2,9±0,3	>0,05	0,112	2,9±1,2	>0,05	-0,12	2,9±0,2	>0,05	-0,164
Log rel CD4:CD8	0,5±0,4	>0,05	0,097	0,6±0,2	>0,05	-0,041	-0,4±0,3	>0,05	0
Log CD3 <sup>+</sup> (%_)	1,9±0,1	>0,05	0,035	1,8±0,1	>0,05	-0,057	1,9±0,1	>0,05	-0,113
Log CD3 <sup>+</sup> (mm <sup>3</sup> )	3,1±0,3	0,077	0,271	3,2±0,1	>0,05	-0,169	3,1±0,2	>0,05	-0,1
Log CD348 (%)	0,4±0,4	>0,05	0,159	0,3±0,1	>0,05	-0,211	0,3±0,1	<0,05	-0,228
Log CD348 (mm <sup>3</sup> )	1,0±0,3	>0,05	0,097	1,1±0,4	>0,05	-0,177	0,9±0,3	0,062	-0,168

Legenda: INNTR/INTR=inibidor não nucleosídeo da transcriptase reversa/inibidor nucleosídeo da transcriptase reversa, INTR/IP= inibidor nucleosídeo da transcriptase reversa/inibidor de protease; VCM=volume corpuscular médio; HCM=hemoglobina corpuscular média;

CHCM= concentração de hemoglobina corpuscular média; RDW= amplitude de distribuição dos eritrócitos; VPM=volume plaquetar médio; CTLF=capacidade total de ligação ao ferro; IL-6= Interleucina 6; PCR= Proteína C reativa

Nota: o valor de p apresentado na tabela, refere-se ao valor encontrado quando realizado o teste de *Pearson* (amostras paramétricas) e teste de *Spearman* (amostras não paramétricos). Este valor de p indica a força do teste para aceitar ou não uma correlação entre duas variáveis.

Fonte: A autora.