

CARGA VIRAL, CONTAGEM DE LINFÓCITOS CD4+ E PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM PACIENTES COM SOROLOGIA REAGENTE PARA ANTI-HIV¹

VIRAL LOAD, CD4+ LYMPHOCYTE COUNT AND LIPID PEROXIDATION IN PATIENTS WITH REAGENT SEROLOGY FOR ANTI-HIV

João Felipe Peres Rezer², Daniela Bitencourt Rosa Leal³ e Juliana Fleck⁴

RESUMO

A infecção pelo HIV afeta diretamente os linfócitos T, que expressam receptores para o CD4+, e sua progressão resulta em depleção progressiva dessas células imunes, o que diminui a habilidade do organismo para combater doenças, chamadas de oportunistas. A linfocitopenia de T CD4+ e o aumento da carga viral são parâmetros determinantes para a progressão da infecção pelo HIV, que culmina no estágio final denominado de AIDS, que é a fase mais avançada da infecção pelo vírus. Um dos principais mecanismos de lesão celular relativos ao estresse oxidativo é a peroxidação lipídica, que se relaciona com a oxidação da camada lipídica da membrana celular. O objetivo neste estudo foi avaliar a contagem de linfócitos T CD4+, a carga viral e a peroxidação lipídica de pacientes com sorologia positiva para anti-HIV em tratamento com antirretrovirais. Nossos resultados indicam que esses pacientes apresentaram um aumento na peroxidação lipídica e 66,6% apresentaram níveis indetectáveis de cópias virais e uma contagem de linfócitos CD4+ satisfatória.

Palavras-chave: HIV, terapia antirretroviral, lipoperoxidação.

ABSTRACT

HIV infection directly affects the T lymphocytes that express receptors for CD4+, and its progression results in the progressive depletion of these immune cells, which decreases the body's ability to fight some diseases called opportunistic. The T CD4+ lymphocytopenia and the increased viral load are crucial parameters for the progression of the HIV infection, which culminates in the final stage called AIDS, which is the most advanced stage of the infection. One of the key mechanisms of cellular injury related to the oxidative stress is lipid peroxidation, which is related to the oxidation of the lipid layer of the cell membrane. The aim of this study is to evaluate the count of lymphocyte T CD4+, the viral load, and the lipid peroxidation in patients with positive serology for anti-HIV in treatment for antiretroviral. The results indicate that these patients had an increase in lipid peroxidation, and 66.6% of them had undetectable levels of viral copies, and a satisfactory count of CD4+ lymphocytes.

Keywords: HIV, antiretroviral therapy, lipid peroxidation.

¹ Trabalho Final de Graduação - TFG.

² Acadêmico do Curso de Biomedicina - Centro Universitário Franciscano. E-mail: joaofeliperezer@gmail.com

³ Colaboradora - UFSM. E-mail: dbitencourtrosaleal@gmail.com

⁴ Orientadora - Centro Universitário Franciscano. E-mail: jfleck@unifra.br

INTRODUÇÃO

No organismo, os radicais livres encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto, seu excesso apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA (HUSAIN et al., 1987).

A peroxidação dos lipídios das membranas celulares é apenas um exemplo de lesão biológica que pode ser promovida pelas espécies reativas de oxigênio, uma vez que praticamente todas as biomoléculas são suscetíveis à oxidação (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989). Da mesma forma que as proteínas e o DNA, os lipídios presentes na membrana celular também são alvo para o dano oxidativo, gerando profundas alterações tanto na organização estrutural quanto nas funções da membrana celular (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; MANOHARAM et al., 2004).

Algumas situações podem ser geradoras de estresse oxidativo, como a ativação de fagócitos (neutrófilos, macrófagos, monócitos e eosinófilos) por micro-organismos, alguns xenobióticos, radiações ionizantes, isquemia e exercício físico intenso (PEREIRA, 1994; BENZI, 1993).

Além de os fagócitos produzirem grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (EROs), quando são ativadas outras células como os fibroblastos, os linfócitos B e as células endoteliais, também há liberação de O_2 e H_2O_2 (MURRELL, 1990). As EROs produzidas por essas células, quando ativadas por micro-organismos patogênicos, atuam como bactericidas, sendo, portanto, um importante meio de proteção orgânica contra o desenvolvimento de infecções oportunistas (CURNUTTE; BABIOR, 1987).

Um dos bem conhecidos produtos da peroxidação lipídica é o malondialdeído (MDA) (ALEXANDROVA; BOCHEV, 2005; CHERUBINI et al., 2005), o qual é o produto final da degradação não enzimática de ácidos graxos poliinsaturados. Altos níveis de MDA elevam a formação de lipoperóxidos, indicando um aumento da peroxidação lipídica (KASHYAP et al., 2005).

Pacientes infectados pelo HIV apresentam, após a infecção aguda, aumento progressivo dos níveis plasmáticos de RNA viral e da destruição do sistema de defesa imune celular, com diminuição do número de linfócitos CD4+ (SABIN et al., 2000). Durante a infecção aguda pelo HIV, o vírus replica-se largamente na ausência de qualquer resposta imune de adaptação, atingindo níveis acima de 100 milhões de cópias/ml. É durante esse ciclo inicial de replicação viral que ocorrem importantes processos patogênicos. Incluem-se a disseminação para uma série de reservatórios tissulares e a destruição de linfócitos CD4+ pelo HIV. Os elevados níveis de virêmia são normalmente de curta duração, indicando que o hospedeiro é capaz de gerar uma resposta imune que controle a replicação. Nas semanas seguintes, a virêmia diminui antes de atingir um ponto estável. Este nível de virêmia que se segue à resolução da infecção aguda é um fator preditivo muito forte da taxa de progressão da doença a longo prazo (ROSENBERG et al., 2000).

O uso da terapia antirretroviral combinada (TARV) melhorou significativamente a evolução clínica dos pacientes, porém, alguns medicamentos podem apresentar perfil oxidativo aumentado e outros efeitos da TARV, como alterações no metabolismo lipídico e muscular (DERESZ et al., 2007).

A infecção pelo HIV produz estresse oxidativo e, secundariamente, dano celular de gravidade variada, e sua regressão é dependente do balanço redox entre oxidantes e antioxidantes (STHEBENS, 2004). As células T CD4+ dos indivíduos HIV positivos são caracterizadas por apresentar baixa capacidade antioxidante (AUKRUST et al., 2003; PRICE et al., 2005). O objetivo neste estudo foi avaliar a contagem de linfócitos T CD4+, a carga viral e a peroxidação lipídica de pacientes com sorologia reagente para anti-HIV em tratamento com terapia antirretroviral.

MATERIAL E MÉTODOS

AMOSTRA

A amostra era composta por 15 pacientes de ambos os sexos infectados pelo HIV, atendidos no ambulatório de doenças infecciosas do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM). O grupo controle era composto por 15 indivíduos saudáveis com sorologia não reagente para anti-HIV. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos.

QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS CD4+

A quantificação das células CD4+ foi realizada por citometria de fluxo (citometro-FACSCalibur). O princípio desse teste consiste na determinação das populações de linfócitos T (timo dependentes), através da identificação de moléculas expressas na sua superfície (*CD-Cluster of Differentiation*). Isso é possível utilizando-se anticorpos monoclonais específicos, ligados a fluorocromos, os quais, durante a análise, permitirão ao citometro de fluxo detectar a fluorescência emitida pelas células marcadas, e assim distingui-las.

CARGA VIRAL

O teste utilizado foi o b-DNA (Branched DNA) HIV-1 RNA 3.0, utilizando-se como produto Versant HIV-1 RNA 3.0 Assay (Siemens), que é um ensaio de hibridação em fase sólida tipo sanduíche de ácidos nucleicos, usando moléculas de DNA ramificadas para determinação quantitativa de RNA do vírus HIV-1 em plasma humano.

PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (TBARS)

A quantificação do conteúdo de TBARS foi realizada em amostras de soro dos pacientes segundo o método de Jentzsch et al. (1996), que utiliza a reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) como marcador de peroxidação lipídica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A peroxidação lipídica (níveis de TBARS) em soro dos pacientes com sorologia positiva para anti-HIV apresentou um aumento estatisticamente significativo com $p < 0,05$. Nos controles, a média encontrada foi de 4,97 nmolMDA/ml ($SD \pm 0,98$), e nos pacientes HIV positivos foi de 14,84 nmolMDA/ml ($SD \pm 10,72$).

Analisando o efeito da ZDV (*zidovudina*), Asunción et al. (2004), em trabalho realizado com mitocôndrias cardíacas de ratos, encontraram aumentos nos níveis de 8-oxo-7,8-diidro-2'-deoxiguanosina nos níveis GSSG e na razão GSSG/GSH, todos marcadores de estresse oxidativo. Também foram verificados aumentos na formação de MDA, indicando lipoperoxidação, como encontrado neste estudo, sendo que em todos os pacientes aqui estudados o uso da zidovudina estava presente entre os medicamentos da terapia antirretroviral.

Os pacientes imunodeprimidos pela infecção causada pelo HIV possuem sérias alterações no metabolismo das células imunes, incluindo alterações bioquímicas. Sugere-se que a indução inapropriada de apoptose de células T está envolvida na perda contínua de células CD4+ durante a infecção pelo HIV-1 (SAMUELSSON et al., 1997).

A evolução da terapia antirretroviral proporcionou aos portadores de HIV/AIDS uma redução significativa na ocorrência de infecções oportunistas, tornando essa doença de caráter crônico e controlável. Os indicadores de mortalidade por AIDS sofreram alterações acentuadas com o advento da terapia antirretroviral combinada, particularmente nos países em que a disponibilidade desses medicamentos é universal e gratuita, como no Brasil.

A adesão ao tratamento é muito importante na síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Chaisson (1999) evidenciou que, para manter a carga viral indetectável por mais tempo e obter aumentos significativos na contagem de linfócitos CD4+ (> 200), a adesão aos medicamentos deve ser superior a 90%. Não encontramos diferença na intensidade da peroxidação lipídica em indivíduos com carga viral detectável.

Os resultados encontrados (Tabela 1) indicam que 66,6% dos pacientes em tratamento no Hospital Universitário de Santa Maria fazem uso correto da terapia antirretroviral, uma vez que a maioria deles apresentou uma taxa indetectável de cópias do vírus/ml.

Tabela 1 - Tabela com a contagem de linfócitos T CD4+, carga viral de pacientes HIV positivos em tratamento com terapia antirretroviral.

| Paciente | Contagem de Linfócitos T CD4+ (μ l) | Carga viral (cópias/ml) |
|----------|--|-------------------------|
| 1 | 431 | < Lim. Mínimo |
| 2 | 323 | < Lim. Mínimo |
| 3 | 109 | 61. 400 |
| 4 | 833 | 74 |
| 5 | 826 | < Lim. Mínimo |
| 6 | 429 | 9. 087 |
| 7 | 546 | < Lim. Mínimo |
| 8 | 797 | < Lim. Mínimo |
| 9 | 98 | 1.158 |
| 10 | 516 | < Lim. Mínimo |
| 11 | 244 | < Lim. Mínimo |
| 12 | 259 | 70 |
| 13 | 446 | < Lim. Mínimo |
| 14 | 440 | < Lim. Mínimo |
| 15 | 159 | < Lim. Mínimo |

< Lim. Mínimo = Inferior ao limite detectável (50 cópias/ ml).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar da significativa melhora nos parâmetros clínicos, virais e imunológicos dos indivíduos HIV positivos que utilizam terapia antirretroviral, alguns medicamentos que a compõem podem desencadear o estresse oxidativo.

A adesão do tratamento está relacionada ao bom prognóstico, possibilitando aumento na contagem de linfócitos CD4+ e manutenção da carga viral indetectável, como encontrado neste estudo, possibilitando, assim, uma melhor qualidade de vida e condições de saúde do paciente com HIV. Mais estudos devem ser realizados; não sabemos se somente a infecção pelo HIV é a responsável pelo estresse oxidativo no grupo estudado, uma vez que todos os pacientes faziam o uso de terapia antirretroviral.

REFERÊNCIAS

ALEXANDROVA, M. L.; BOCHEV, P. G. Oxidative stress during the chronic phase after stroke. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 39, p. 297-316, 2005.

ASUNCIÓN, J. G. et al. AZT induces oxidative damage to cardiac mitochondria: protective effect of vitamins C and E. **Life Sciences**, v. 76, p. 47-56, 2004.

AUKRUST, P. et al. Disturbed glutathione metabolism and decreased antioxidants levels in human immunodeficiency virus-infected patients during highly active antiretroviral therapy Potential immunomodulatory effects of antioxidants. **J Infect Dis**, v. 188, p. 232-238, 2003.

- BENZI, G. Aerobic performance and oxygen freeradicals. **The J. Sports Med. Physical Fitness**, v. 33, p. 205-222, 1993.
- CHAISSON, R. E. Take as directed? Adherence and outcomes of therapy. In: VI CONFERENCE ON RETROVIRUSES AND OPORTUNISTIC INFECTIONS. **Anais...** 1999. Chicago. Medscape. 1999. Disponível em: <<http://w.medscape.com/viewarticle/424964>>. Acesso em: 30 out. 2010.
- CHERUBINI, A. et al. Potential markers of oxidative stress in stroke. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 39, p. 841-852, 2005.
- CURNUTTE, J. T.; BABIOR, B. M. Chronic granulomatous disease. **Adv. Human Genetics**, v. 16, p. 229-297, 1987.
- DERESZ L. F. et al. O estresse oxidativo e o exercício físico em indivíduos HIV positivo. **Rev Bras Med Esporte**, v. 13, n. 4 p. 275-279, 2007.
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, p. 61-68, 1997.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radical in Biology and Medicine**. 2º ed. Oxford: University Press, 1989. 543pp.
- HUSAIN, S. R.; CILLARD, J.; CILLARD, P. Hydroxyl radical scavenging activity of Flavonoids. **Phytochem**, v. 26, p. 2489-2491, 1987.
- JENTZSCH, A. M. et al. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. **Free Radic Biol Med.**, v. 20, p. 251–256, 1996.
- KASHYAP, M. K. et al. Different antioxidant status, total antioxidant power and free radical in essential hypertension. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 277, p. 89-99, 2005 .
- MANOHARAN, S; KALANJIAPPAN, K; KAYALVIZHI, M. Enhanced lipid peroxidation and impaired enzymic antioxidant activities in the erythrocytes of patients with cervical carcinoma. **Cell. Mol. Biol. Lett.**, v. 9, p. 699-707, 2004.
- MURRELL, G. A. C. Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals. **Biochem. J**, v. 265, p. 659-665, 1990.
- PEREIRA, B. Exercício físico como pró-oxidante. **Rev. Paul. Ed. Fís.** v. 8, p. 77-89, 1994.
- PRICE T. O. et al. HIV-1 viral proteins gp 120 and Tat induce oxidative stress in brain endothelial cells. **Brain Res**, v. 1045, p. 57-63, 2005.

ROSENBERG, E. S.; ALTFELD, M., POON, S. H., et al. Immune control of HIV-1 after early treatment of acute infection. **Nature**, v. 407, p. 523-526, 2000.

SABIN, C. A. et al. Course of viral load throughout HIV-1 infection. **J. Acquired Immune Def. Syndr**, v. 23, p. 172-177, 2000.

SAMUELSSON, A. et al. Apoptosis of CD4+and CD19+Cells during Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection - Correlation with Clinical Progression, Viral Load, and Loss of Humoral Immunity. **Virology**, v. 238, p. 180-188, 1997.

STEBBENS, W. E. Oxidative stress in viral hepatitis and AIDS. **Exp Mol Pathol**, v. 77, p. 121-32, 2004.

