

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

João Felipe Peres Rezer

**MARCADORES INFLAMATÓRIOS, CARDÍACOS E EXPRESSÃO  
DE ECTOENZIMAS DO SISTEMA PURINÉRGICO EM  
PLAQUETAS DE PACIENTES HIV POSITIVOS**

Santa Maria, RS

2016

**João Felipe Peres Rezer**

**MARCADORES INFLAMATÓRIOS, CARDÍACOS E EXPRESSÃO  
DE ECTOENZIMAS DO SISTEMA PURINÉRGICO EM  
PLAQUETAS DE PACIENTES HIV POSITIVOS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas – Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Daniela Bitencourt Rosa Leal

Santa Maria, RS  
2016

**João Felipe Peres Rezer**

**MARCADORES INFLAMATÓRIOS, CARDÍACOS E EXPRESSÃO  
DE ECTOENZIMAS DO SISTEMA PURINÉRGICO EM  
PLAQUETAS DE PACIENTES HIV POSITIVOS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas – Análises Clínicas e Toxicológicas.

**Aprovado em 25 de abril de 2016:**

---

Daniela Bitencourt Rosa Leal Dr<sup>a</sup> (UFSM)  
Presidente/orientador

---

Fabio Vasconcellos Comim Dr. (UFSM)

---

Jamile Fabbrin Gonçalves Dr<sup>a</sup> (IFF)

---

Vera Maria Melchiors Morsch Dr<sup>a</sup> (UFSM)

---

Cláudio Alberto Martins Leal Dr. (UFRGS)

Santa Maria, RS

2016

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais João Aramis e Dalva Rezer;  
Aos meus irmãos Jean e Naila, minha afilhada Brenda;  
Minha noiva Carina;*

*Estes, que sempre estiveram presentes, mesmo quando eu estive fisicamente ausente!*

## AGRADECIMENTOS

Deus, obrigado por ter me guiado sempre...

Mãe e Pai, obrigado por serem tão amáveis, exemplares e me permitirem mesmo que com alguns obstáculos chegar até aqui, o sonho se realizou a partir da força que vocês sempre me transmitiram. Estas frases não conseguem expressar minha gratidão e sentimentos por vocês!

Meus irmãos e cunhados, obrigado por me transmitirem uma tranquilidade única, um apoio que sei que sempre terei, por estarem presentes na minha vida! Brendinha, obrigado por permitir que meu espírito de criança seja cada dia renovado.

Carina, Nina meu amor... obrigado, estamos juntos nessa vida, compartilhando momentos, sonhos e desafios. Teu amor e tua forma de ver o mundo fizeram com que a trajetória até aqui fosse muito mais leve, mais especial. Te amo, te amo! Obrigado por me fazer sempre entender que o hoje é um dia que vale a pena viver.

Agradeço muito a UFSM, esta universidade com grandes profissionais, que ao longo dessa jornada fizeram parte dos meus dias...

Colegas e amigos do Laboratório 4229, anos de convivência, desafios e amizade... A caminhada é longa e quando encontramos pessoas especiais pelo caminho, o tempo passa mais rápido. Muito sucesso a todos vocês sempre. Obrigado!

Professores, funcionários e alunos da UNIJUÍ. Obrigado por entenderem este momento e sempre me apoiarem. Compartilhando palavras e experiências.

Obrigado ao HUSM, pela oportunidade. Muito obrigado aos pacientes, a luta é grande, mas a batalha não é em vão!

Obrigado ao PPGCF, secretários, coordenação sempre solícitos.

Agradeço especialmente a minha orientadora Professora Daniela Bitencourt Rosa Leal, profissional que me inspirou a chegar onde estou. Desde minha formação na graduação. Sempre com o seu apoio e as suas orientações.

Agradeço a banca, que destinou o seu tempo para avaliar este trabalho.

Por fim, agradeço a todos que estiveram presentes em minha vida, pessoal ou profissional durante essa etapa.

## EPÍGRAFE

*“Nossa cultura é frágil demais em consciência da finitude humana. Falta maturidade, integridade, realidade. O tempo acaba, mas a maioria das pessoas não percebe que quando olha o relógio repetidas vezes esperando o fim do dia, na verdade estão torcendo para que sua morte se aproxime mais rápido. Quando passamos a vida esperando pelo fim do dia, pelo fim de semana, pelas férias, pelo fim do ano, pela aposentadoria, estamos torcendo para que o dia da nossa morte se aproxime mais rápido. Dizemos que depois do trabalho vamos viver, mas esquecemos que a opção “vida” não é um botão “on/off” que a gente liga e desliga conforme o clima ou o prazer de viver. Com ou sem prazer, estamos vivos 100% do tempo. Vida é coisa constante. Vida acontece todo dia e poucas vezes as pessoas parecem se dar conta disso”.*

*(Ana Cláudia Quintana Arantes)*

## RESUMO

# MARCADORES INFLAMATÓRIOS, CARDÍACOS E EXPRESSÃO DE ECTOENZIMAS DO SISTEMA PURINÉRGICO EM PLAQUETAS DE PACIENTES HIV POSITIVOS

AUTOR: João Felipe Peres Rezer

ORIENTADORA: Daniela Bitencourt Rosa Leal

Local e Data: Santa Maria, 25 de abril de 2016.

*Estudos atuais têm demonstrado que a infecção pelo HIV e o tratamento antirretroviral podem favorecer um estado pró-coagulante e dislipidemias, os quais contribuem para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. As plaquetas estão envolvidas nas cardiopatias, e possuem numerosas enzimas, entre elas as ectoenzimas do sistema purinérgico, responsáveis pela hidrólise de nucleotídeos de adenina. Estes nucleotídeos e o nucleosídeo da adenina induzem nas células diferentes respostas como proliferação, diferenciação, quimiotaxia, liberação de citocinas, angiogênese, ativação de células endoteliais e agregação plaquetária. São eles o ATP, o ADP, o AMP e a adenosina, cujas concentrações extracelulares são controladas pela atividade das enzimas E-NTPDase (CD39), E-5'-nucleotidase (CD73), E-NPP e ecto-adenosina deaminase (E-ADA). Diante disso, este estudo objetivou, quantificar as citocinas pró e anti-inflamatórias (IL-6, IL-17, IFN-gamma, TNF, IL-10, IL-4, IL-2); e os marcadores cardíacos (troponina, LDH, CK, CK-MB, PCR); avaliar a atividade e expressão de ectoenzimas em plaquetas de pacientes HIV positivos, verificando assim a importância da sinalização purinérgica na tromborregulação, na resposta imune e inflamatória. Avaliou-se ainda, a agregação plaquetária, o perfil lipídico e a atividade in vitro destas ectoenzimas utilizando doses próximas às terapêuticas. Foram incluídos no estudo pacientes HIV positivos, em acompanhamento no ambulatório de infectologia do HUSM. Os resultados revelaram alterações na atividade das ectoenzimas (E-NTPDase, E-5'-nucleotidase e E-ADA) em plaquetas, sem apresentar alteração na expressão. A E-NTPDase mostrou alteração ( $P < 0.05$ ) na hidrólise do ATP em no grupo HIV em relação ao grupo controle. Para a hidrólise de ADP foi observada uma menor atividade ( $P < 0.05$ ) no grupo HIV HAART em comparação com o grupo de controle. O grupo HIV HAART em comparação com o grupo HIV diminuiu 1,2 vezes a hidrólise do ADP ( $P < 0,05$ ). Hidrólise enzimática do AMP aumentou em 53% ( $P < 0.05$ ) no grupo HIV, em comparação com o grupo de controle. Entre o grupo controle e HIV HAART não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) na hidrólise do AMP. E-ADA apresentou uma redução de 49.6% na sua atividade no grupo HIV HAART em comparação com o grupo controle. Também foi observada uma redução de 34,8% na atividade de E-ADA, quando comparado o grupo HIV com o grupo controle ( $P < 0,05$ ). Não houve diferença significativa entre os grupos HIV HAART e HIV ( $P > 0,05$ ) na*

*atividade da E-ADA. A agregação plaquetária destes pacientes revelou-se aumentada, em 26% e 40% usando o agonista ADP ( $P < 0,05$ ). Foram observadas alterações no perfil lipídico, com aumento nos níveis séricos de colesterol LDL, redução no colesterol HDL e aumento de triglicérides no grupo de pacientes HIV positivos sob o uso de terapia antirretroviral. Estes pacientes apresentaram uma elevação ( $P < 0,05$ ) nas concentrações séricas de IL-6 e INF-gamma ( $P < 0,05$ ), sem alteração de marcadores cardíacos específicos; com exceção da proteína C reativa (PCR) que também é marcador inflamatório. Não houve alteração significativa na atividade *in vitro* das ectoenzimas em plaquetas quando incubadas com os fármacos antirretrovirais. Os resultados sugerem que as ectoenzimas do sistema purinérgico estão envolvidas no processo de tromborregulação dos pacientes HIV positivos. Indicam ainda alterações nos perfis inflamatório, lipídico e de agregação plaquetária que podem corroborar para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Os parâmetros relatados neste estudo podem ser úteis na identificação do risco cardiovascular, no monitoramento da patologia e no acompanhamento da evolução do tratamento antirretroviral no seu uso crônico.*

**Palavras –chave:** HIV. Plaquetas. CD39. CD73. Inflamação.

## ABSTRACT

# INFLAMMATORY MARKERS / CARDIACS, ECTOENZYMES ACTIVITY AND EXPRESSION IN PLATELETS OF PATIENTS HIV POSITIVE

AUTHOR: João Felipe Peres Rezer

GUIDANCE: Daniela Bitencourt Rosa Leal

Place and Date: Santa Maria, April 25, 2016.

Recent studies have demonstrated that HIV infection and antiretroviral treatment may favor a procoagulant state and dyslipidemia, which contribute to developing cardiovascular diseases. Platelets are involved in heart disease, as well as its enzymes, including purinergic system ectoenzymes responsible for the hydrolysis of adenine nucleotides. ATP, ADP, AMP and adenosine are adenine nucleotides and nucleosides that induce different cellular processes such as proliferation, differentiation, chemotaxis, cytokine release, angiogenesis, endothelial cell activation and platelet aggregation. Their extracellular concentrations are controlled by the activity of the enzymes E-NTPDase (CD39), and 5'-nucleotidase (CD73), E-NPP and ecto-adenosine deaminase (E-ADA). Therefore, this study aimed to quantify the proinflammatory and anti-inflammatory cytokines (IL-6, IL-17, IFN-gamma, TNF, IL-10, IL-4, IL-2); and cardiac markers (troponin, LDH, CK, CK-MB, PCR); evaluate the ectoenzymes activity and expression in platelets of HIV-positive patients, thus verifying the importance of purinergic signaling in thromboregulation, and immune and inflammatory responses. Platelet aggregation, lipid profile and in vitro activity of these ectoenzymes using close to therapeutic doses were also evaluated. The study included HIV-positive patients followed up at the infectious diseases clinic at HUSM. The results showed changes in ectoenzymes (E-NTPDase, E-5'-nucleotidase and E-ADA) activity in platelets without changes in expression. The hydrolysis of ATP was altered in the HIV group when compared to the control group. Regarding the hydrolysis ADP, lower activity was observed in HIV-HAART group compared to the control group. The HIV-HAART group compared with the HIV group decreased 1.2 times the hydrolysis of ADP. Enzymatic hydrolysis of AMP increased by 53% in the HIV group compared to the control group. Between the control group and HIV HAART there was no significant difference in the hydrolysis of AMP. E-ADA showed a reduction of 49.6% in its activity in HIV HAART group compared with the control group. It was also observed a reduction of 34.8% in the activity of E-ADA compared the HIV group with the control group. There was no significant difference between HIV HAART and HIV groups in the E-ADA activity. The platelet aggregation of these patients revealed it was increased by 26% and 40% using the agonist ADP ( $P < 0.05$ ). Changes in the lipid profile, with an increase in serum levels of LDL cholesterol, reduced HDL cholesterol and high triglycerides were observed in the group of HIV-positive patients under antiretroviral therapy. These patients had an increase in serum IL-6 and IFN-gamma with no changes in *specific cardiac markers*; with

*the exception of C-reactive protein (CRP) which is also an inflammatory marker. There was no significant change in the in vitro activity of platelet ectoenzymes when incubated with antiretroviral drugs. The results suggest that ectoenzymes purinergic system are involved in the process of thromboregulation in HIV positive patients. In addition, these results indicate changes in inflammatory, and platelet aggregation lipid profiles that may concur to the development of cardiovascular diseases. The parameters reported in this study may be useful in the identification of cardiovascular risk, monitoring of the disease and monitoring the evolution of antiretroviral treatment in their chronic use.*

Key words: HIV. Platelets. CD39. CD73. Inflammation.

## LISTA DE FIGURAS

### REFERÊNCIAL TEÓRICO

Figura 1: Estrutura do HIV .....	18
Figura 2: Fármacos utilizados na terapia antirretroviral.....	22
Figura 3: Fatores de risco para o desenvolvimento de doença cardiovascular durante a infecção pelo HIV .....	23
Figura 4: Ectoenzimas envolvidas na degradação de nucleotídeos e nucleosídeos .....	29

### ARTIGO I

TABLE 1: Evaluation of cellular integrity in platelet preparation .....	36
TABLE 2: Coagulation parameters of healthy volunteers (control), HIV-untreated patients (HIV) and patients receiving highly active antiretroviral therapy (HIV/HAART) .....	36
TABLE 3: Lipid profile of healthy volunteers (control), HIV-untreated patients (HIV) and patients receiving highly active antiretroviral therapy (HIV/HAART).....	36
FIGURE 1: E-NTPDase activity in platelets .....	37
FIGURE 2: Ecto-5'-nucleotidase activity in platelets .....	38
FIGURE 3: Ecto-Adenosine deaminase (E-ADA) activity in platelets.....	38
FIGURE 4: Platelet aggregation profile .....	39
Grafical Abstract .....	42

## **MANUSCRITO I**

TABLE 1: Cardiac markers of HIV-positive patients on antiretroviral therapy...47

FIGURE 1: Inflammatory cytokines (IL-2, IL-4, IL-6) of healthy volunteers and HIV-positive patients ..... 48

FIGURE 2: Inflammatory cytokines (IL-10, IL-17, TNF and IFN-gamma) of healthy volunteers and HIV-positive patients.....49

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ADP:** Adenosina difosfato
- AGEs:** Produtos finais da glicação avançada
- AMP:** Adenosina monofosfato
- ATP:** Adenosina trifosfato
- AMPc:** Adenosina monofosfato cíclico
- ADA:** Adenosina deaminase
- CDC:** Center for Disease Control and Prevention
- CK:** Creatina quinase
- CK- MB:** Creatina quinase – músculo e cérebro
- CTL:** Linfócito T citotóxico
- DNA:** Ácido desoxiribunucleíco
- E-NTPDase:** Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase
- E-NPP:** ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase
- E-5-NT:** Ecto-5'-nucleotidase
- E-ADA:** Ecto-adenosina desaminase
- HADL:** Lipodistrofia dislipidêmica associada ao HIV/HAART
- HDL:** High Density Lipoproteins
- HIV:** Vírus da Imunodeficiência Humana
- HMGB1:** High mobilitygroup box protein-1
- HUSM:** Hospital Universitário de Santa Maria
- IN:** Integrase
- LDL:** Low Density Lipoproteins
- MAPK:** Proteína quinase ativada por mitógeno
- PCR:** Proteína C reativa
- PIC:** Complexo de pré-integração
- PR:** Protease
- PPP:** Plasma pobre em plaquetas
- PRP:** Plasma rico em plaquetas
- PVHA:** Pessoas vivendo com HIV/AIDS

**RAGE:** Receptor for advanced glycation end products

**RNA:** Ácido ribonucleico

**SIDA:** Síndrome da imunodeficiência humana

**SLHIV:** Síndrome lipodistrófica do HIV

**TARV:** Terapia antirretroviral

**TLRs:** Toll like receptors

**TR:** Transcriptase reversa

**TCD4+:** Linfócito T helper

**TCD8+:** Linfócito T auxiliar

**VPR:** Proteína viral R

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2. REFERÊNCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>17</b>
<b>3 OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>33</b>
3.1 Objetivos específicos.....	33
<b>4.METODOLOGIA E RESULTADOS.....</b>	<b>34</b>
4.1 ARTIGO I.....	35
4.2 MANUSCRITO I.....	37
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>54</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>60</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>62</b>
<b>8. APÊNCICE.....</b>	<b>72</b>
8.1 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	72
<b>8. ANEXO I: APROVAÇÃO DO COMITÉ DE ÉTICA.....</b>	<b>76</b>

## INTRODUÇÃO

A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) é acompanhada por alterações funcionais relacionadas ao sistema imunológico e a respostas bioquímicas. Este vírus é transmitido basicamente pelas vias sexual, parenteral e vertical (UNAIDS, 2014). Desde sua descoberta, no início da década de 80, até o ano de 2015, foram registrados no Brasil, 798.366 casos (BRASIL, 2015).

O HIV infecta predominantemente as células TCD4+, e a destruição dessas células pode ocorrer pelo efeito citopático do vírus. Adicionalmente, existe um aumento da apoptose dessas células e, por expressarem antígenos virais no nível da membrana, as células podem também ser destruídas por citotoxicidade mediada pela célula TCD8+, fenômeno que também contribui para a redução das células CD4+. Sendo a célula TCD4+ uma das mais importantes na cooperação da resposta imune, a diminuição numérica e a alteração de sua função levam a uma supressão da resposta imunológica (MACHADO e CARVALHO, 2004) e ao envolvimento de mecanismos inflamatórios.

A terapia antirretroviral (TARV), baseada em esquemas contendo pelo menos três fármacos, mostra-se altamente eficaz na redução da mortalidade associada à infecção pelo HIV. Entretanto, a TARV pode induzir complicações metabólicas graves, tais como resistência à insulina, síndrome metabólica, lipodistrofia e doenças cardiovasculares. Os efeitos metabólicos da TARV no incremento do risco de aterosclerose precoce e acelerada, em pacientes infectados por HIV, são cada vez mais evidentes (KELESIDIS & CURRIER, 2014; ASHK et al., 2015; ESTRADA et al., 2015).

Desta forma, com os avanços tecnológicos e o melhor conhecimento da etiopatogenia da AIDS, a avaliação de ectoenzimas em plaquetas e os perfis lipídico, inflamatório e cardíaco, são importantes para melhor compreensão da tromborregulação e o risco cardiovascular na infecção pelo HIV.

## REFERÊNCIAL BIBLIOGRÁFICO

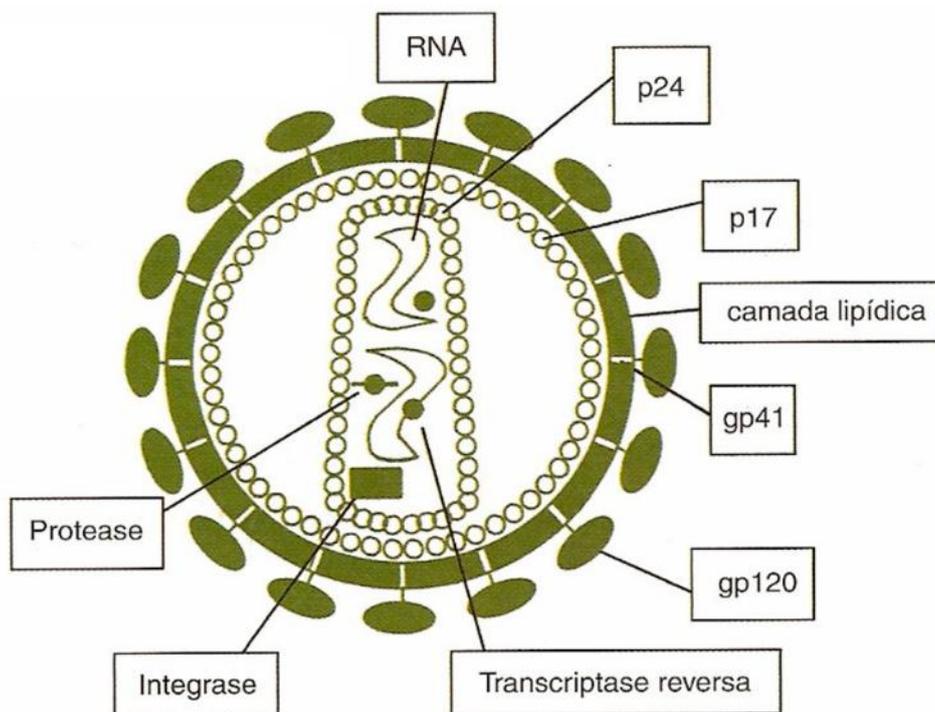
A síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) é causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e esta doença é caracterizada por ser uma infecção crônica (KLIMAS et al., 2008). O HIV pertence a uma classe de micro-organismos denominada de retrovírus e ao subgrupo lentivírus (CHIU e YANIV et al., 1985). Evidências relatam que o HIV, anteriormente teria como seu hospedeiro natural o chimpanzé e foi transmitido para o homem no início do século XX nos países do oeste africano (KEELE et al., 2006).

No ano de 1981, a epidemia da infecção pelo HIV teve seu início, quando o *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) relatou a morte de cinco indivíduos homossexuais masculinos devido a uma infecção pulmonar rara causada pelo agente *Pneumocystis carinii* (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 1981), hoje denominado *Pneumocystis jiroveci*. A identificação do agente causador desta epidemia foi reconhecida somente no ano de 1983 (FAUCI, 1999; ELEOPULOS et al., 2004).

Este vírus tem sua estrutura (FIGURA 1) formada por um envelope, uma bicamada lipídica derivada da célula do hospedeiro e as glicoproteínas gp120 e gp41, responsáveis pela entrada do vírus na célula do hospedeiro. Internamente, uma matriz proteica (p17) envolve o capsídeo viral (p24). No interior do capsídeo está o genoma viral que consiste de duas fitas simples de RNA associadas a três enzimas virais, denominadas transcriptase reversa (TR), integrase (IN) e protease (PR) (BARRE-SINOUSSE, 1996).

O HIV se subdivide em dois tipos geneticamente diferentes (BUTLER et al., 2007). O HIV-1 é o vírus predominante nas regiões da Europa, Estados Unidos, África Central e América do Sul, incluindo o Brasil, sendo o mais prevalente entre os dois tipos. O HIV-2 é encontrado principalmente em indivíduos infectados na região oeste do continente Africano, possuindo características muito similares ao HIV-1, visto que tem o mesmo tropismo por células do sistema imune e causa a síndrome da imunodeficiência aguda (TEBIT et al., 2007).

Figura 1: Estrutura do HIV



Fonte: Adaptado de BRASIL; 2013.

A transmissão do HIV acontece durante o contato sexual sem o uso de preservativos, de mãe para filho, na exposição a produtos contaminados com sangue e em usuários de drogas injetáveis que podem contaminar-se com o vírus assim como em pessoas que manipulam inadequadamente produtos contendo sangue contaminado (SLEASMAN; GOODENOW, 2003).

Dados atuais revelam que desde o início da epidemia de AIDS no Brasil, até junho de 2015, foram registrados no país 798.366 casos de AIDS. Além disso, o último boletim epidemiológico destaca que, em 2014, o ranking das Unidades da Federação com as maiores taxas de detecção de HIV/AIDS, mostra que o estado do Rio Grande do Sul, apresenta a segunda maior taxa de detecção, com valores de 38,3 casos para cada 100 mil habitantes, ficando atrás somente do Amazonas com 39,2 casos (BRASIL, 2015).

Como citado anteriormente, a maioria das infecções pelo HIV ocorre através das mucosas do trato genital ou retal durante a relação sexual. Nas primeiras horas após a infecção pela via sexual, o HIV e células infectadas

atravessam a barreira da mucosa, permitindo que o vírus se estabeleça no local de entrada e continue infectando linfócitos TCD4+ (TCD4+), além de macrófagos e células dendríticas (BRASIL, 2013).

Após a transmissão do HIV, as células dendríticas, os macrófagos e os linfócitos TCD4+ migram e hospedam o vírus para região dos tecidos linfoides durante um período de três a cinco dias. Essas células permitem que ocorra a replicação viral dentro de aproximadamente quatorze dias após a exposição (ZHANG et al., 1999).

O ciclo de vida do HIV pode ser dividido em fases precoces e tardia. Geralmente, a fusão viral inicia-se após uma interação entre as glicoproteínas virais e a superfície das células TCD4+. Isto é seguido pelo desencapsulamento do vírus e a transcrição reversa do genoma do RNA viral em DNA pró-viral. Subsequentemente, o DNA recém sintetizado é associado a um complexo de núcleo-proteína, denominado complexo de pré-integração (PIC), que inclui a proteína viral matriz, transcriptase reversa, integrase e a proteína acessória VPR (proteína viral R) (NISOLE; SAIB, 2004).

Este ciclo viral tem sequência com a expressão do gene pró-viral pela maquinaria da célula hospedeira, o que resulta em poliproteínas precursoras virais. A poliproteína gag-pol, é clivada pela enzima viral protease, ocorrendo então a produção de proteínas virais maduras para a montagem do virion. Isto é seguido pelo brotamento, maturação viral e finalmente, a liberação de virions infectantes para novas células do hospedeiro (LAITH; NOURI, 2007).

Fatores como infecções oportunistas, marcadores de ativação imunológica e perda de peso dos indivíduos infectados, estão associados com a progressão da doença causada pelo HIV. Em alguns casos, estes fatores, podem estar relacionados com a diminuição da sobrevida, os quais podem ser relacionados entre os indicadores da gravidade e/ou progressão da doença (SULLIVAN et al., 1998; SULLIVAN, 2002).

A infecção pelo HIV-1 cursa com um amplo espectro de manifestações clínicas, desde a fase aguda até a fase avançada da doença. Em pessoas que se infectam com o HIV e não realizam tratamento, é estimado que o tempo médio entre o contágio e o aparecimento da doença esteja em torno de dez anos (BRASIL, 2013).

A evolução da infecção pelo HIV inicia com a infecção primária ou fase aguda da infecção, que geralmente é assintomática e corresponde ao período de elevada carga viral. Em geral, as manifestações começam a surgir de duas a quatro semanas após a contaminação e podem apresentar características clínicas inespecíficas como febre, linfadenopatia, cefaleia, mialgia, artralgia, anorexia, náusea, vômito, diarreia e exantema maculopapular eritematoso. Mas a fase aguda é autolimitante e rápida, com duração aproximada de até 30 dias. A infecção primária de curso mais severo tem sido relacionada a uma rápida progressão da doença. Nesta fase, os exames laboratoriais apresentam uma diminuição na contagem de células T CD4+ (BARTLETT; MOORE, 1999).

A soroconversão em geral ocorre após duas a seis semanas do contágio e antes desse período, os testes sorológicos para a detecção de anticorpos anti-HIV-1 não são reagentes em decorrência da pequena quantidade de anticorpos produzida e também devido à sensibilidade dos testes. Este período é compreendido como janela imunológica, quando a resposta imune adaptativa é capaz de controlar parcialmente a infecção e a replicação viral (STAPRANS; FEINBERG, 2004).

Com a resolução do quadro de infecção primária e a soroconversão, o paciente entra na fase crônica da infecção assintomática sendo conhecida como fase de latência clínica. Esta fase pode subsistir por vários meses ou até alguns anos. A replicação viral permanece nos órgãos linfoides, porém, identifica-se um processo de equilíbrio dinâmico no qual a destruição das células TCD4+ é parcialmente contrabalanceada pela sua produção. Por conseguinte, ocorre uma destruição lenta e gradativa de células TCD4+, macrófagos e células dendríticas (BARTLETT; MOORE, 1999; GESKUS et al., 2007).

Ao término do período de latência, com o declínio constante de células T CD4+, o sistema imunológico começa a evidenciar a sua fragilidade frente ao HIV-1; apresentando a contagem absoluta de células TCD4+ que pode chegar a níveis abaixo de 200 céls/mm<sup>3</sup> e o surgimento de doenças oportunistas, caracterizando assim, o início da infecção sintomática pelo HIV e o desenvolvimento de AIDS (KARON et al., 1992; BARTLETT; MOORE 1999, STAPRANS; FEINBERG, 2004).

Nos primeiros anos da epidemia, a maioria dos indivíduos infectados progredia para um estado de quase completa destruição das funções do sistema imunológico. Anteposto, vale destacar que somente a partir do ano de 1996, com o surgimento da terapia antirretroviral (TARV), houve uma grande mudança no curso da história natural da infecção pelo HIV. O uso combinado dos antirretrovirais levou à redução acentuada da carga viral plasmática, elevação significativa e prolongada no número de linfócitos TCD4+ e, conseqüentemente, à diminuição de qualquer processo definidor de AIDS e da mortalidade relacionada ao HIV (HOGG et al., 1993; MARINS et al., 2003; D'ARMINIO et al., 2005).

Os fármacos antirretrovirais disponíveis (FIGURA 2) para o uso podem ser divididos em quatro grupos de acordo com o mecanismo pelo qual eles interrompem o ciclo de vida do vírus. Estes grupos dividem-se entre: os Inibidores da transcriptase reversa, que inibem a transcriptase reversa viral por competição com os nucleotídeos naturais, ou por redução da sua atividade catalítica. Já os inibidores de protease desativam a protease e com isso, impedem a geração de novos virions capazes de infectar outras células. Outra classe são os inibidores de integrase que atuam impedindo a integração do DNA viral no genoma nuclear. Os inibidores de fusão impedem a fusão entre o invólucro do vírus e a membrana da célula hospedeira (APOSTOLOVA et al., 2011).

Com o advento desta terapia, a sobrevivência de pacientes infectados pelo HIV melhorou significativamente. No entanto, em estudos de observação, o uso da terapia antirretroviral foi fortemente associado com o risco de doença cardiovascular (FOWKES et al., 2003; KLEIN et al., 2005; UNAIDS/WHO, 2008).

Figura 2 - Fármacos atualmente utilizados na terapia antirretroviral (TARV) combinada com seu mecanismo de ação e principais efeitos adversos

Classe	Nome genérico	Mecanismo de ação	Efeitos adversos
Inibidores da Transcriptase Reversa Análogos de Nucleosídeos (ITRN)	Abacavir (ABC), Didanosina (ddl), Estavudina (d4T), Lamivudina (3TC), Zidovudina (AZT) Tenofovir (TDF)*	Impedem a infecção aguda das células, pois atuam sobre a transcriptase reversa, impedindo que o RNA viral se transforme em DNA complementar	toxicidade mitocondrial; toxicidade hepática, lipotrofia, anemia, miopatia, neuropatia periférica, pancreatite
Inibidores da Transcriptase Reversa Não-Análogos de Nucleosídeos (ITRNN)	Efavirenz (EFZ), Nevirapina (NVP), delavirdina		Elevação das enzimas hepáticas, dislipidemia, exantema e síndrome de Stevens-Johnson.
Inibidores de Protease (IP)	Fosamprenavir (FAPV), Atazanavir (ATV), Darunavir (DRV), Indinavir (IDV), Lopinavir (LPV), Nelfinavir (NFV), Ritonavir (RTV), Saquinavir (SQV)	Atuam impedindo a clivagem da protease do polipeptídeo precursor viral e bloqueia a maturação do vírus	Toxicidade metabólica; lipodistrofia, dislipidemia, hiperglicemia, resistência a insulina, diabetes, intolerância gastrointestinal, toxicidade hepática
Inibidores da entrada do HIV  Inibidor da fusão	  Enfuvirtida (T-20)	Impedem a entrada do material genético viral pela sua ação no mesmo local da entrada do HIV na célula que expressa receptor CD4	Reações de Hipersensibilidade, principalmente local, ou, mais raramente sistêmica

\*análogo de nucleotídeo.

Fonte: Adaptado de KRAMER et al., 2008.

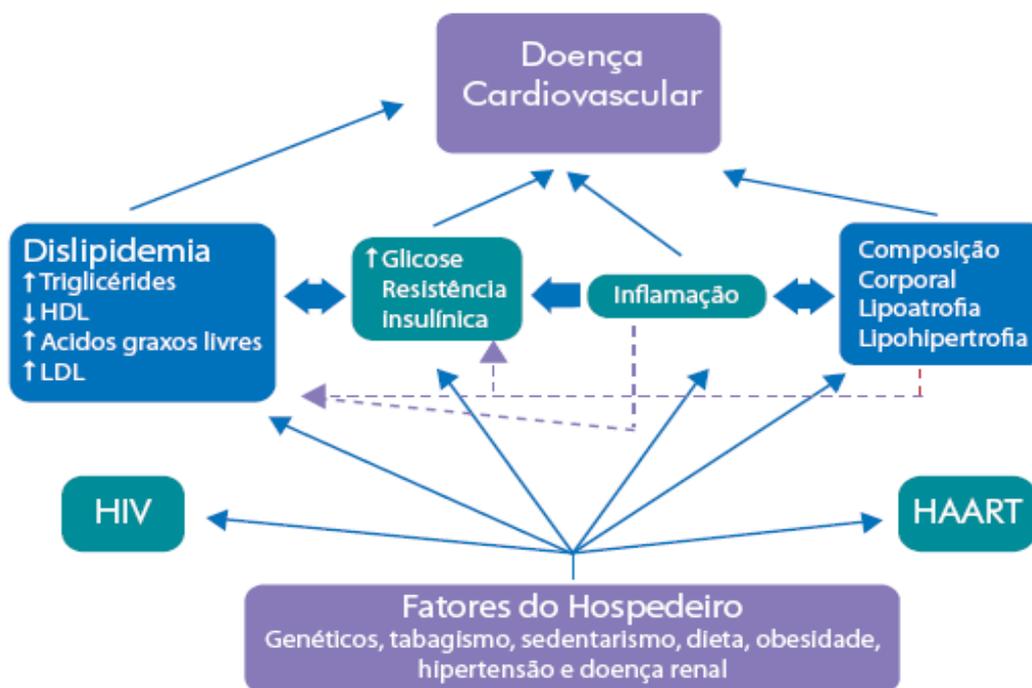
Anterior ao início da terapia antirretroviral, pensou-se que a doença cardíaca coronariana relacionada ao HIV estava associada à infecção pelo citomegalovírus ou ao HIV *per si*, apesar da associação entre a infecção viral e lesões arteriais coronarianas não ter ficado bem estabelecida (ANDERSON et al., 1990). Posteriormente, estudos imuno-histoquímicos possibilitaram a documentação objetiva da presença do HIV em artérias coronárias comprometidas por inflamação e obstrução aterosclerótica (BARBARO et al., 2001).

Em avaliações internacionais (BATTEGAY et al., 2009; MARTNEZ et al., 2009) e nacionais (PACHECO et al., 2008), foi revelado que as doenças cardiovasculares, bem como as anormalidades metabólicas pró-aterogênicas induzidas pela TARV e a inflamação crônica associada à infecção pelo HIV, influenciam na sobrevida dos pacientes infectados pelo HIV submetidos à TARV.

Diversos distúrbios clínicos e laboratoriais de lipídios e metabolismo da glicose têm sido cada vez mais relacionados em pacientes com infecção por

HIV após o advento da terapia antirretroviral (VIRABEN; AQUILINA, 1999; BEHRENS et al., 1999). Várias vias metabólicas foram postuladas para explicar o uso da terapia antirretroviral associada a alterações no metabolismo lipídico, incluindo a indução da resistência à insulina, a inibição da lipoproteína-lipase causada por fator de necrose tumoral-alfa, a supressão da replicação do HIV, ou mudanças sutis no sistema endócrino e na homeostase (CALZA; MANFREDO; CHIODO, 2003). Estes e outros fatores estão ilustrados na figura 3:

Figura 3: Fatores de risco para o desenvolvimento de doença cardiovascular durante a infecção pelo HIV



Fonte: Adaptado de GRUNFELD, C. et al., 2008

Algumas nomenclaturas já foram postuladas para a SLHIV (síndrome lipodistrófica do HIV (CARR, 2000), tais como síndrome da redistribuição da gordura corporal (HADIGAN, 2003), síndrome metabólica associada à terapia anti-retroviral (ARV) (MONTESSORI et al., 2004) ou, lipodistrofia dislipidêmica associada ao HIV/HAART (HADL) (BALASUBRAMANYAN et al., 2004).

Sposito e colaboradores (2007) evidenciaram que o aumento da incidência de eventos vasculares e trombóticos agudos nestes pacientes foi atribuído também à trombofilia e a um perfil lipídico desfavorável devido à redução dos níveis de HDL e à elevação de triglicerídeos e de lipoproteínas.

Além disso, tem sido demonstrado que uma alta proporção de pacientes tratados com TARV, especialmente aqueles que incluem inibidores de protease, apresentam distúrbios metabólicos (dislipidemia, resistência à insulina) e alterações fisiológicas (lipodistrofia e lipoatrofia), bem como aumento do risco de doença cardiovascular (doença arterial coronariana e acidente vascular cerebral) (MULLIGAN et al., 2000; BARBARO, 2003; SWEET, 2005; GRINSPOON; CARR, 2005).

Em dezembro de 2013, o Brasil publicou o “Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para o Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos” (PCDT), dando mais um importante passo para a resposta à epidemia, ao se tornar o primeiro país em desenvolvimento e o terceiro do mundo a recomendar o início imediato da TARV para todas as pessoas HIV positivas, independentemente da contagem de células CD4+. Vários estudos revelam que o início cada vez mais precoce da TARV não só melhora a qualidade de vida das pessoas vivendo com HIV/AIDS (INSIGHT et al., 2015), mas também reduz o risco da transmissão do vírus (COHEN et al., 2011; LIMA et al., 2015), e essa recomendação foi posteriormente adotada por diversos outros países e pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (BRASIL, 2015).

As respostas adaptativas contra o HIV, principalmente, a de linfócitos T citotóxicos (CTL) específicos, suprimem a replicação viral, mas contribuem igualmente para o aumento da ativação imune crônica (KOTTILIL et al., 2000). A ativação celular de TCD8+ nos indivíduos infectados tem sido relacionada à diferenciação atípica na população de células T (CHAMPAGNE et al., 2001), devido a um processo que envolve a via de sinalização “proteína quinase ativada por mitógenos” (MAPK) (D’SOUZA et al., 2008). Esta via também contribui com a patogênese da doença, pois é ativada em resposta a estímulos contínuos de estresse e ao ambiente pró-inflamatório. Diversas das etapas do ciclo de replicação do HIV parecem depender desse estímulo de mitógenos,

como o desbloqueio da transcrição reversa e integração completa do DNA pró-viral (ZYBARTH et al., 1999).

As alterações inflamatórias subclínicas que ocorrem na parede arterial, desencadeadas por fatores de risco cardiovascular, são implicadas na patogênese da doença aterosclerótica (ROSS, 1999). Embora a infecção pelo HIV provoque imunossupressão e conseqüente diminuição da resposta inflamatória sistêmica, a mesma provoca profundas alterações da função endotelial, semelhante às encontradas na reação inflamatória subclínica própria da doença aterosclerótica difusa. Os níveis elevados de fator de von Willebrand, uma glicoproteína que provoca agregação plaquetária, são encontrados nestas duas situações e se correlacionam com níveis de citocinas pró-inflamatórias. Considerando que os níveis plasmáticos de fator de von Willebrand têm valor prognóstico na doença coronariana se faz necessário também salientar que a expressão da proteína S está diminuída na infecção pelo HIV e auto- anticorpos pró-trombóticos anti-fosfolípidos são produzidos em maior quantidade nestes pacientes (SUDANO et al., 2006).

A avaliação sistemática da creatino quinase (CK total) e da subfração MB (CKMB) pós-intervenção coronária percutânea revela que 5% a 40% dos pacientes tratados com sucesso apresentam elevação do nível sérico destas enzimas, o que provavelmente representa necrose miocárdica em algum grau (ADELMEGUID, 1996; CALIFF et al., 1998; HOLMES, 2001). Sabe-se ainda, que a análise de outros marcadores bioquímicos muito sensíveis e específicos para a identificação de lesão miocárdica como a troponina, intensificou a detecção deste fenômeno, que tem sido muito mais frequentemente observado na população (CENTEMERO et al., 2000; STONE et al., 2001).

Sabe-se que a infecção e a replicação do HIV são continuamente regulados por uma rede de citocinas e várias das citocinas envolvidas nesta rede têm sido relatadas por modular a replicação de HIV-1 em células da linhagem de macrófagos (KEDZIERSKA et al., 2003). Com isso, a resposta inflamatória e tromborregulatória podem ter papéis importantes no desenvolvimento de doenças cardiovascular durante a infecção pelo HIV.

Neste sentido, a função endotelial tem sido implicada na aterogênese, no controle do comportamento dinâmico de placa, e prevê a ocorrência de

futuros eventos cardiovasculares (LAING et al., 1996; LOUW et al., 2008). Consta-se que as plaquetas, além de participar da cicatrização de feridas durante o reparo tecidual e da hemostasia, são componentes envolvidos também nos processos inflamatórios e imunológicos (PAGE, 1989; WEKSLER, 1992).

As plaquetas desempenham um papel fundamental na hemostasia, intervindo rapidamente na presença de lesões endoteliais. Possuem aproximadamente 3  $\mu\text{m}$  de diâmetro, sem núcleo, com forma e tamanho variável (FROJMOVIC & PANJWANI, 1976), resultando da fragmentação dos megacariócitos na medula óssea (CASTRO et al., 2006). A contagem normal em adultos é de 150-450 X 10<sup>9</sup>/L, onde 70% estão presentes na circulação e 30% no baço. A produção plaquetária leva aproximadamente 4 dias e possui uma vida média de 9 dias em um ser humano normal (HARKER & FINCH, 1969). Vários hormônios e citocinas interferem no desenvolvimento dos megacariócitos, como eritropoetina e interleucinas 3 (IL-3), 6 (IL-6) e 11 (IL-11) (KAUSHANSKY, 1995).

A membrana da plaqueta é constituída por uma camada bifosfolipídica, contendo muitos receptores responsáveis pelo desencadeamento da ativação plaquetária e de reações de adesão-agregação (ZAGO et al., 2004). Estes receptores são ativados por diferentes agonistas como o colágeno, fator de von Willebrand (FvW), ADP, ATP, epinefrina e a trombina. Os receptores plasmáticos são glicoproteínas (GPs) com estruturas distintas como, por exemplo, o receptor GPIb-IX-V, que é um complexo de proteínas da família das moléculas ricas em leucinas; o receptor GPVI da superfamília das imunoglobulinas; ou ainda os receptores de ADP/ATP ou de trombina, que são receptores purinérgicos e integrinas (HARTWIG, 2002).

O citoesqueleto é composto por uma rede de estruturas filamentosas que fornece a sustentação para a forma discóide da plaqueta, e por um sistema contrátil que permite a mudança da forma discóide para a forma dendrítica, perante seu estado de ativação (LORENZI et al., 2003). Esta mudança permite o prolongamento de pseudópodos, a contração interna e a liberação dos constituintes granulares.

O sistema tubular denso é um conjunto de túbulos no citoplasma, que constitui o principal local de armazenamento do cálcio intraplaquetário (LORENZI et al., 2003). O sistema canalicular aberto consiste numa rede membranosa intracitoplasmática que permite a troca de moléculas com o meio externo, por onde ocorre a liberação dos grânulos de secreção quando a plaqueta está ativada (CASTRO et al., 2006).

As plaquetas circulam normalmente no sangue como entidades isoladas que não interagem umas com as outras ou com outros tipos celulares. Entretanto, sob um trauma vascular ou tecidual, com exposição do subendotélio e do colágeno subjacente, as plaquetas rapidamente aderem ao local lesado, formando um tampão hemostático primário e iniciando uma série de fenômenos que tem por finalidade evitar a hemorragia (SCHAFER, 1996; LORENZI et al., 2003).

Com isso, fica evidente que as plaquetas são as principais responsáveis pela manutenção da integridade vascular, sendo capazes de responder rapidamente frente a qualquer alteração no endotélio vascular devido a suas propriedades de adesão, liberação de substâncias e agregação. Ressalta-se ainda, que os eventos cardiovasculares resultantes da oclusão por trombos em locais que apresentam ruptura de placas devido à ativação, adesão de plaquetas e à formação de coágulo de fibrina são a principal causa de morte e invalidez mundial (BAKKER et al., 1994; BIRCK et al., 2002; MARCUS et al., 2001). Diversas biomoléculas são capazes de desempenhar papéis importantes nas funções plaquetárias. Considerando isto, vale ressaltar que aproximadamente 90% dos nucleotídeos presentes nas plaquetas são constituídos por nucleotídeos de adenina (LUTHJE & OGILVIE, 1983).

Sendo assim, é importante frisar que diversos estudos referem que os nucleotídeos, ATP e ADP, secretados por leucócitos, plaquetas e células endoteliais danificadas, servem como mediadores capazes de modular o processo inflamatório e trombose vascular (RALEVIC & BURNSTOCK, 1998). Após a infecção em humanos por agentes patogênicos, respostas imunes são montadas para controlar os agentes da infecção. O sistema de sinalização purinérgica desempenha um importante papel na modulação da resposta imune e inflamatória através de biomoléculas extracelulares, como os nucleotídeos da

adenina (ATP, ADP e AMP) e seu derivado nucleosídeo adenosina (ZIMMERMANN, 2000; RALEVIC & BURNSTOCK, 2003).

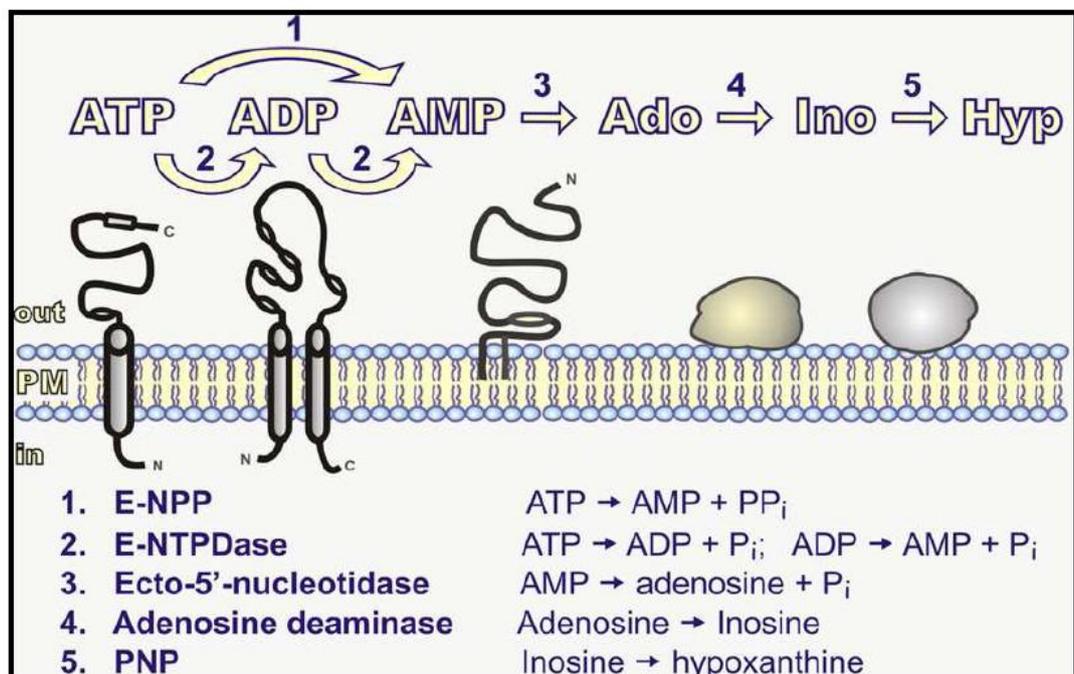
Os nucleotídeos da adenina como ATP, ADP e AMP e o nucleosídeo adenosina não são capazes de atravessar a membrana celular, porém podem realizar suas ações biológicas através de receptores purinérgicos específicos que estão presentes na superfície celular (DI VIRGÍLIO et al., 2001). Ao interagirem com os receptores purinérgicos presentes na superfície celular, sinalizam vias de grande importância que medeiam diversos efeitos biológicos, incluindo a contração do músculo liso, a neurotransmissão, a resposta imune, a agregação plaquetária, a inflamação, a dor e a modulação da função cardíaca (RALEVIC & BURNSTOCK, 1998). O ATP possui diversas funções fisiológicas, como a neurotransmissão, a inibição da agregação plaquetária, e a indução da secreção de importantes mediadores por parte dos linfócitos T como INF- $\alpha$  e IL-2 que estão envolvidos na resposta imune (RALEVIC & BURNSTOCK, 1998). O ADP não possui um papel definido nos linfócitos (DI VIRGILIO et al, 2001), porém nas plaquetas, ele age como um importante mediador da agregação plaquetária e da tromborregulação, podendo ser liberado na circulação sanguínea após danos teciduais (ZIMMERMANN, 1999).

Em condições fisiológicas, estes nucleotídeos são encontrados no meio extracelular em baixas concentrações (DI VIRGILIO et al, 2001). No entanto, altas concentrações do ATP extracelular podem formar poros nas membranas celulares, resultando em mudanças osmóticas na célula (LEAL et al., 2005), levando à morte celular.

O ATP extracelular e seus metabólitos são reconhecidos por duas famílias de receptores purinérgicos P1 e P2, presentes na superfície de diversas células. Os purinoreceptores P2 podem ainda ser divididos em duas subclasses: acoplados à proteína G (chamados de P2Y) e os ligados a canais iônicos (designados P2X) (DI VIRGÍLIO et al, 2001). As enzimas que hidrolisam nucleotídeos extracelulares são as responsáveis por regular as concentrações de nucleotídeos extracelulares nos tecidos, sendo conhecidas como ectonucleotidases. Estas estão ancoradas à superfície celular e podem ser classificadas como família das E-NTPDases (ecto-difosfohidrolases, apirase, CD39, E.C 3.6.1.5) e ecto-5'-nucleotidase (CD73; E.C 3.1.3.5), que finaliza a

cascata ectonucleotidásica com a hidrólise dos nucleotídeos monofosfatados, resultando em adenosina (ZIMMERMANN, 1996). Essas enzimas atuam formando uma cascata enzimática que é continuada pela ação da ectoenzima adenosina desaminase (E-ADA; E.C 3.5.4.4) (CRISTALLI et al, 2001). Estas ectoenzimas são ilustradas em cascata na figura 4.

Figura 4: Ectoenzimas envolvidas na degradação de nucleotídeos e nucleosídeos da adenina.



Fonte: Adaptado de Yegutkin, 2008.

A E-NTPDase inicia a cascata de hidrólise de nucleotídeos da adenina, sendo conhecida como um marcador de superfície celular (CD39). Esta enzima encontra-se presente em linfócitos, plaquetas e células do endotélio vascular, desempenhando importante controle da função dos linfócitos, incluindo o reconhecimento do antígeno e ativação de funções efetoras das células T citotóxicas (FILIPPINI et al., 1990), além da capacidade de gerar sinais que amplificam interações célula-célula (KACSMAREK et al., 1996).

Oito membros desta família já foram identificados e diferem quanto à especificidade de substratos, distribuição tecidual e localização celular. As E-NTPDases 1, 2, 3 e 8 localizam-se na superfície celular com o sítio catalítico voltado para o meio extracelular. Já as E-NTPDases 5 e 6 tem expressão intracelular e as E-NTPDases 4 e 7 têm sua localização intracelular, voltada para o lúmen da organela citoplasmática (ROBSON et al., 2006).

As E-NTPDases expressam seus genes em vertebrados e também em invertebrados, plantas, fungos e importantes patógenos humanos, como *Herpetomonas muscarum*, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania amazonensis*, *Trichomonas vaginalis*, *Schistosoma mansoni* e *Trypanosoma cruzi*, atuando como facilitadores da infecção, estando possivelmente envolvidos com a captação de purinas, capacidade infectiva e modulação da resposta imune do hospedeiro (BERMUDES et al., 1994; BERREDO-PINHO et al., 2001; ALVES-FERREIRA et al., 2003; DE JESUS et al., 2002; FIETTO et al., 2004; PENIDO et al., 2007).

Um aumento na expressão da CD39 já foi observado em plaquetas de pacientes diabéticos e hipertensos; pacientes com doença de chagas (LUNKES et al., 2008; SOUZA et al., 2012). A presença de E-NTPDase, na membrana de células endoteliais, constitui um fator preponderante na manutenção da homeostasia vascular (BIRK et al., 2002). Enfatiza-se ainda, que as respostas trombóticas e inflamatórias podem ser moduladas pela expressão da CD39/ATPDase (KOZIAK et al., 1999).

Por sua vez, a enzima ecto-5'-nucleotidase é um marcador de superfície celular (CD73), indicativo de maturação de linfócitos (THOMPSON et al., 1986). Esta amplamente distribuída em bactérias, plantas e animais, a enzima catalisa a hidrólise da ligação fosfodiéster de vários nucleosídeos 5'-monofosfatado (ex.: AMP) a seus respectivos nucleosídeos (ex.: adenosina) (ZIMMERMANN, 1996). Até o momento, sete membros da enzima E-5'-nucleotidase foram isolados e caracterizados em humanos, diferindo entre si através das suas propriedades moleculares e cinéticas, bem como de sua especificidade pelo substrato e localização celular (BOROWIEC et al., 2006).

A enzima adenosina desaminase (E-ADA; E.C. 3.5.4.4) é parte do conjunto de enzimas responsáveis pela degradação dos nucleotídeos e nucleosídeos da adenina (YEGUTKIN, 2008). Responsável por catalisar a desaminação irreversível da adenosina e 2'-deoxiadenosina em inosina e 2'-deoxinosina, respectivamente (RESTA et al., 1998; ROBSON et al., 2006).

A E-ADA pode ser encontrada em praticamente todos os vertebrados. Nos humanos existe na forma de duas isoenzimas classificadas como ADA1 e ADA2, cada uma com suas particulares propriedades bioquímicas (SHAROYAN et al., 2006). A regulação da concentração extracelular de adenosina, foi uma das primeiras funções fisiológicas atribuídas à ecto-ADA, logo após sua descoberta na membrana celular (FRANCO et al., 1997).

A adenosina é liberada de células, dependendo da sua concentração intracelular ou ser proveniente da degradação do ATP extracelular devido à ação de ectonucleotidases. O controle da sinalização adenosinérgica também pode ser exercido através da via de recuperação da adenosina através de transportadores de nucleosídeos, seguida por fosforilação à AMP pela adenosina quinase ou desaminação à inosina pela ADA citosólica (HASKÓ; CRONSTEIN, 2004). A adenosina é uma biomolécula que sinaliza processos endógenos regulando diversos processos tanto fisiológicos como patológicos (FREDHOLM et al., 2001). Este nucleosídeo é produzido em resposta a situações de estresse metabólico ou dano celular e altas concentrações de adenosina extracelular ocorrem em situações de isquemia, hipóxia inflamação e trauma (HASKÓ; CROSTEIN, 2004). As concentrações de adenosina extracelulares em situações hemostáticas ficam em níveis nanomolares (10 a 20 nM), já em situações de estresse tecidual ou hipóxia estes níveis são elevados a concentrações micromolares (10 a 100µM) (FREDHOLM et al., 2001).

Com isso, sabe-se que os processos fisiológicos cardiovasculares são controlados por uma complexa rede de sinalização celular. Entre os seus mensageiros menos compreendidos, estão os nucleotídeos da adenina (ATP, ADP e AMP) e o seu derivado nucleosídeo (adenosina). Como referido anteriormente, essas moléculas regulam diferentes mecanismos. Os níveis extracelulares de ATP, ADP e AMP e do nucleosídeo adenosina, são regulados,

principalmente, pela sua hidrólise através das ectoenzimas E-NTPDase, E-5'-nucleotidase e E-ADA citadas anteriormente. Este conjunto, juntamente com os receptores purinérgicos, formam o sistema purinérgico, que é caracterizado por ser uma via de sinalização importante, desencadeando múltiplos efeitos celulares, incluindo resposta imune, inflamação, dor, agregação plaquetária, vasodilatação mediada pelo endotélio, proliferação e morte celular (BURNSTOCK; KNIGHT, 2004).

Diante do exposto, a avaliação da atividade e expressão de ectoenzimas que degradam nucleotídeos e nucleosídeo da adenina em plaquetas, dos perfis lipídico, inflamatório e de agregação plaquetária, bem como dos parâmetros cardíacos, é necessária para uma melhor compreensão da fisiopatologia do HIV/AIDS e do risco de doença cardiovascular envolvido.

### 3. OBJETIVO GERAL

Avaliar os marcadores inflamatórios e as ectoenzimas que degradam nucleotídeos e nucleosídeo da adenina em plaquetas de pacientes HIV positivos.

#### Objetivos específicos:

Em indivíduos controles e pacientes HIV positivos:

- Determinar a atividade das enzimas E-NTPDase, E-5'-nucleotidase e E-ADA em plaquetas;
- Determinar a expressão de CD39 e CD73 em plaquetas;
- Avaliar o perfil lipídico (colesterol total, LDL, HDL e triglicerídeos);
- Avaliar a agregação plaquetária;
- Determinar as concentrações de citocinas pró- inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17, IFN-gamma) e anti-inflamatórias (IL-2, IL-4, IL-10) no soro.
- Avaliar os níveis séricos de marcadores cardíacos (CK, CK-MB, troponina, PCR, DHL).
- Verificar o efeito de doses terapêuticas da terapia antirretroviral na atividade de ectoenzimas (E-NTPDase e E-5'-nucleotidase) em plaquetas *"in vitro"*.

#### **4. METODOLOGIA E RESULTADOS**

Os resultados que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de um artigo e um manuscrito. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas, encontram-se compondo o próprio artigo/manuscrito e representam a íntegra deste estudo.

##### **1) ARTIGO PUBLICADO:**

“Effect of antiretroviral therapy in thromboregulation through the hydrolysis of adenine nucleotides in platelets of HIV patients”. Publicado na revista *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2016. Este artigo encontra-se em uma arquivo em anexo.

##### **2) MANUSCRITO:**

“Changes in inflammatory/cardiac markers of HIV positive patients and *in vitro* effect of antiretroviral therapy on the activities of ectonucleotidases in human platelets”. O manuscrito está estruturado de acordo com as normas da revista científica para o qual será submetido: *Clinical Biochemistry*.

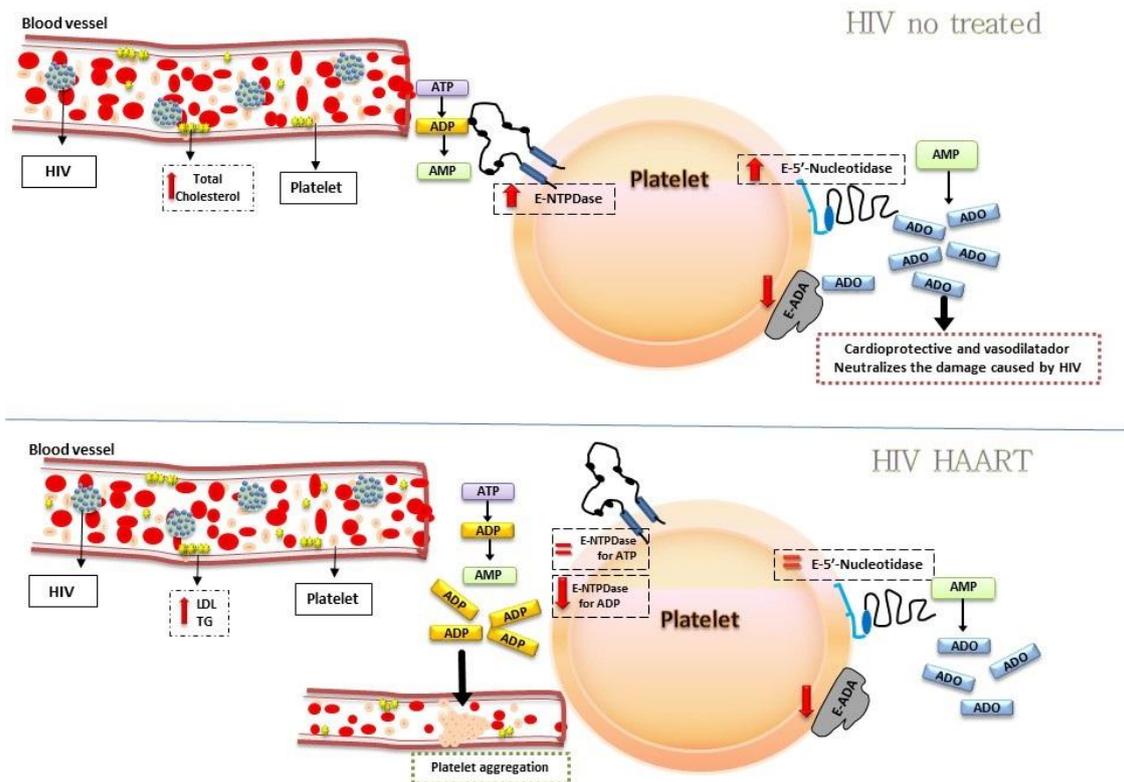
## ARTIGO 1











### Graphical abstract do artigo 1:

**Group untreated HIV:** The figure shows an increase in total cholesterol and these patients an increase in activity of the enzyme is 5'-nucleotidase, indicating that the hydrolysis of nucleotide AMP is high. In contrast to E-ADA enzyme activity is decreased indicating that the nucleoside adenosine (Ado) is being accumulated in the extracellular medium for their cardioprotective effects and vasodilators are acting and / or neutralizing the damage caused by HIV.

**HIV HAART group:** The figure shows an increase in LDL cholesterol and triglycerides. The activity of enzyme E-NTPDase is reduced to ADP indicates that the nucleotide is at increased levels in the extracellular medium also realizes the increase of platelet aggregation, as this agonist is ADP aggregation. Since the E-ADA activity is decreased in order to maintain inventory adenosine (Ado) in the extracellular medium which is to play its role cardioprotective against cardiovascular risk generated by increased LDL cholesterol, triglycerides and platelet aggregation.



**MANUSCRITO I****CHANGES IN INFLAMMATORY/CARDIAC MARKERS OF HIV POSITIVE PATIENTS AND *IN VITRO* EFFECT OF ANTIRETROVIRAL THERAPY ON THE ACTIVITIES OF ECTONUCLEOTIDASES IN HUMAN PLATELETS**

João F. P. Rezer<sup>a</sup>, Stephen A. Adefegha<sup>a</sup>, Assis Ecker<sup>b</sup>, Daniela Passos<sup>a</sup>,  
Renata Pereira<sup>a</sup>, Tatiana M. D. Bertoldo<sup>a</sup>, Daniela B. R. Leal<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.*

<sup>b</sup> *Programa de Pós- graduação em Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.*

***Abstract***

HIV replication promotes atherogenesis and participates in the immune response to the virus, thereby influencing the inflammatory profile. These changes may, in turn, contribute to the risk of cardiovascular diseases with involvement of platelets. However, adenine nucleotides and nucleosides involved in thromboregulation and modulation of immune response may therefore be affected by these alterations. Objectives: This study sought to evaluate the profile of pro and antiinflammatory cytokines (IL-10, IL-6, IL-17, TNF, IL-4, IL-2 and IFN-gamma), cardiac markers (troponin, CK, CK MB, DHL, CRP) in HIV-positive patients and assess the *in vitro* effect of antiretroviral therapy on the activities of ectonucleotidases (E-NTPDase and E-5'-nucleotidase) in human platelets. Design and Methods: Ten blood samples were obtained from ten HIV positive patients at the Infectious Disease Clinic of the Federal University of Santa Maria, Brazil and ten HIV negative individuals (control group) for this study. Results: The results revealed that there were significant ( $P < 0.05$ ) increases in serum levels in IL-6 and IFN-gamma with no significant ( $P > 0.05$ ) change in the serum levels cardiac markers investigated (CK, CK-MB, troponin, DHL and CRP). In addition, the ectonucleotidases (E-

NTPDase and E-5'-nucleotidase) activities were not altered ( $P>0.05$ ) in human platelets when incubated with different antiretroviral drugs - *in vitro*.  
Conclusions: This study suggests that the changes in some inflammatory markers could indicate possible therapeutic targets in the management of HIV and ectonucleotidases may serve as peripheral markers in patients undergoing some antiretroviral drugs.

Key words: Inflammation; HIV; antiretroviral drug, E-NTPDase; E-5'-nucleotidase.

\* Corresponding authors:

Prof. Dr. Daniela Bitencourt Rosa Leal ([dbitencourtrosaleal@gmail.com](mailto:dbitencourtrosaleal@gmail.com))

Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências da Saúde,  
Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, prédio 20, 97105-900. Santa  
Maria, RS, Brazil.

Fax: + 55-55322-08242

## 1. *Introduction*

The survival of patients infected with the Human Immunodeficiency Virus (HIV) has improved significantly with the advent of antiretroviral therapy. However, the use of antiretroviral therapy was strongly linked with the risk of cardiovascular diseases [1, 2, 3]. Before the commencement of antiretroviral therapy, it was thought that HIV-related coronary heart disease was associated with cytomegalovirus infection or HIV itself, even though association between viral infection and coronary artery injuries has not been well-established [4]. Later, immunohistochemical studies revealed an objective documentation of the association between HIV and coronary arteries impaired by inflammation and atherosclerotic obstruction [5]. Several clinical and laboratory disorders of lipid and glucose metabolism have been increasingly reported in patients with HIV infection after the advent of antiretroviral therapy [6, 7].

Cardiac involvement in infection HIV/AIDS occurs without obvious clinical manifestations that are masked by immunosuppressed above the patient develops, but may lead to serious complications and consequent death if not diagnosed (by clinical and laboratory testing) and treatment.

Platelets participate in wound healing, tissue repair, homeostasis and are involved in inflammatory and immune processes [8, 9]. Furthermore, they are responsible for the maintenance of the integrity of the vasculature and respond quickly against any change in vascular endothelium due to their abilities to bind, release substances and aggregate. It is worth noting that cardiovascular events resulting from the occlusion by thrombus sites present in plaque rupture due to the activation and adhesion of platelets as well as formation of fibrin clot leading to disability and death and [10, 11].

Several molecules play crucial roles in platelet function, including adenine nucleotides (ATP, ADP and AMP). The enzyme E-NTPDase (EC 3.6.1.5; CD39) is responsible for the hydrolysis of ATP and ADP to AMP and plays an important role in controlling blood flow by regulating the catabolism of ADP. Moreover, micromolar concentrations of ADP are known to be sufficient to induce platelet aggregation in humans [12]. At

high concentrations, ATP is a competitive inhibitor of the mediated by ADP-mediated action [13] and exerts proinflammatory function through the stimulation and proliferation of lymphocytes [14].

The enzyme E-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5, CD73) hydrolyzes AMP, generates adenosine and completes the metabolism of ATP [15]. Adenosine is a potent inhibitor of platelet aggregation and an important modulator of vascular tone [16]. It acts as a protective agent in tissues and plays a vital role in the immune system by promoting the maturation of monocytes [17] and lymphocytes [18]. Furthermore, adenosine has potent antiinflammatory and immunosuppressive activities by inhibiting the proliferation of T cells through the activation of A2A receptors and release of antiinflammatory cytokines [19]. In HIV infection, the immune cells are altered and these alterations could lead to the increase or decrease of cytokine secretion and immunodeficiency. It is therefore important to evaluate the profile of inflammatory cytokines and cardiac markers of HIV positive patients and assess the effect of antiretroviral drugs on the ectonucleotidases (E-NTPDase and E-5'-nucleotidase) activities in human platelets (*in vitro*).

## 2. Materials and methods

### 2.1 *Materials*

Nucleotides and Trizma base were purchased from Sigma (Saint-Louis, MO, USA). All other reagents used in the experiments were of analytical grade and of the highest purity.

### 2.2 *Patients*

The study was performed on ten (10) subjects with positive serology for HIV that have diagnosed at Infectious Diseases clinic in the University Hospital of Santa Maria. The control group consisted of ten (10) healthy volunteers with confirmed of nonreactive serology for HIV, no history of smoking, hypertension or diabetes and who had not been submitted to any pharmacological treatment within the last 30 days. The volunteers were randomly selected for different experiments. This work was

appreciated and approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Santa Maria under the number: 1122509.

### *2.3 Preparation of drug solutions and enzymatic assay*

Based on pharmacokinetic information, therapeutic plasma concentrations of four (4) different antiHIV drug classes; nucleoside analog reverse transcriptase inhibitors [Zidovudine (8.5 $\mu$ M)], Lamivudine (8.8 $\mu$ M)], Didanosine (6.0 $\mu$ M) and [Tenofovir (5.0 $\mu$ M)]; protease Inhibitor [Atazanavir (7.6 $\mu$ M)]; integrase inhibitor [Raltegravir(3.6 $\mu$ M)]; fusion inhibitor [Enfuvirtide (1.0 $\mu$ M)] and entry inhibitor [Maraviroc (1.7 $\mu$ M)] were tested on the activities of the ectonucleotidases *in vitro*. The drugs (two concentrations above and one below and apart the therapeutic dose) were incubated with human platelets (0.2 – 0.6  $\mu$ g/ $\mu$ l) and exogenous ATP/ADP/AMP substrates. E-NTPDase and E- 5'- nucleotidase activities were determined using the colorimetric malachite green phosphate assay.

### *2.4 Platelet preparation*

Platelet-rich preparation (PRP) was performed using the method of Pilla et al. [20] modified by Lunkes et al. [21]. Briefly, peripheral blood was collected in 0.129 M sodium citrate as anticoagulant and centrifuged at 160  $\times$  g for 15 min. Afterwards, the PRP was centrifuged at 1,400 $\times$ g for 30 min and washed twice with 3.5 mM HEPES buffer, pH 7.0, containing 142 mM NaCl, 2.5 mM KCl and 5.5 mM glucose. The washed platelets were resuspended in HEPES isosmolar buffer.

### *2.5 Protein determination*

After separation of platelets, the protein was adjusted to 0.4-0.6 mg / ml according to Bradford [22] using bovine serum albumin as the standard for enzyme assays prior to the addition of the doses of drugs.

### *2.6 Determination of cardiac markers*

Cardiac markers analysis was carried out by well-established methods in the clinical laboratory routine analysis. PCR and DHL in serum were determined by immunoturbidimetry using the automated COBAS MIRA® device. Serum troponin was measured by chemiluminescence using routine methodology with the automated apparatus LIAISON®.

### *2.7 Concentration of cytokines*

By means of a commercial kit BD Cytometric Bead Assay Th1/ Th2/ Th17 Cytokine (CBA) was used to determine the serum concentrations (pg / ml) TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17, IFN, IL-2, IL-4 and IL-10 in serum according to the manufacturer's instructions (BD Biosciences). The samples were analyzed using flow cytometer BD Accuri™.

### *2.8 Statistical analysis*

Data were analyzed by T test followed by Tukey-Kramer test, considering a level of significance of 5%.

## *3. Results*

### *3.1 Inflammatory markers*

There was a significant increase in serum levels ( $P < 0.05$ ) in interleukin - 6 (IL-6) in HIV-positive group ( $26.47 \pm 8.35$ ;  $n=7$ ) when compared to the control group ( $5.13 \pm 0.51$ ;  $n=10$ ) as shown in Figure 1. A significant ( $P < 0.05$ ) increase in interferon gamma (IFN) was also observed in HIV-positive group ( $3.983 \pm 0.711$ ;  $n=8$ ) when compared to the control group ( $2.26 \pm 0.36$ ;  $n=9$ ) as presented in Figure 2. There were no significant ( $P > 0.05$ ) differences in other analyzed cytokines (IL-10, IL-17, TNF, IL-4 and IL-2) of HIV<sup>+</sup> and control groups.

### 3.2 Cardiac markers

The results of cardiac markers in serum (CK, CK-MB, troponin, DHL and CRP) were compared to the reference values established by the clinical laboratory where the tests took place. The reference values are; CPK: 26-189 U/L, CPK-MB: 0-25 U/L, Troponin: <0.5 ng/mL, DHL: 200- 480 U/L and CRP: 0-6 mg/L. It was observed that all the cardiac markers analyzed were within reference values in HIV<sup>+</sup> patients (n =10), except for CRP that was increased by 40% (n=4) in HIV<sup>+</sup> patients (Table 1).

### 3.3 *E-NTPDase and E-5'-nucleotidase activity platelets "in vitro" on antiretroviral effects*

The four classes of anti-HIV drugs tested showed no statistically significant differences in relation to the control (without the anti-HIV drugs). The hydrolyses of ATP, ADP and AMP were not significantly ( $P>0.05$ ) changed in any of the concentrations tested in the drugs (Lamivudine, zidovudine, didanosine and tenofovir; Atazanavir; Raltegravir and maraviroc when compared with the control (data not shown).

## 2. Discussion

The resistance and the development of viral infections depend on various effector mechanisms involving cytokines and chemokines, which mediate early defense in innate and adaptive immunity [23]. The effects of cytokines are pleiotropic and are influenced by concentrations, presence or absence of other cytokines. Inflammatory and immune interactions in the pathophysiology of HIV are very complex. A network of cytokines may continuously regulate infection and replication of HIV and several of the cytokines involved in the network that could modulate HIV-1 replication in macrophage lineage cells [23].

The increased IL-6 level in plasma of HIV positive patients observed in this study is in agreement with earlier studies where chronic activation of the immune system was reported to be an important predictor of

progression of HIV infection [24]. Increased CD38 and HLA-DR expression in T cells as well as elevated plasma cytokine levels such as IL-6 and TNF $\alpha$  cytokine are indicative of immune activation [24, 25, 26, 27]. In addition, antiretroviral therapy may enhance life expectancy and control viral replication in HIV infection, but may leave the infected patients with high risk of morbidity, including liver disease, cancer and cardiovascular disease [28].

Considering the above, our results display an increased pro-inflammatory profile in the HIV-positive patients, shown by increase serum levels of IFN-gamma and IL-6. Elevated production of pro-inflammatory cytokines caused by HIV infection can manifest itself systemically with hemodynamic instability or metabolic disorders.

C-reactive protein (CRP) is a marker of inflammation that plays a central role in cardiovascular disease. According to Stefano et al. [29], CRP can be elevated even when changes in traditional markers such as troponin are not identified. Furthermore, CRP may not be considered an independent marker when it is elevated and troponin is undetectable ( $> 0.01$  mg/L). There could be an indication of heart damage when negative result is obtained in the determination of troponin due to the assay sensitivity (0.2 mg/L) [29]. In addition, troponin and creatine kinase (CK) are traditional markers of myocardial damage [30]. In this study, evaluated HIV positive patients showed no changes in troponin values and creatine kinase (CK), while there was 40% increase in the levels of CRP. CRP is an acute phase protein synthesized by the liver and regulated by cytokines, predominantly IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-1 [31]. In this sense, the increase in serum IL-6 levels identified in our study could be corroborating the synthesis of CPR which also was high in HIV positive patients.

It was observed that the IL-4 levels (anti-inflammatory) in HIV positive individuals did not change when compared to the control group. The results obtained agree with previous assertion in that increased

levels of IFN-gamma (pro-inflammatory) and normal levels of IL-4, IL-10 (anti-inflammatory) were found in HIV patients. Inflammatory markers can measure other characteristics besides the atherosclerotic mass. These characteristics may include the activity of the population of lymphocytes and macrophages or the degree of plaque destabilization leading to ulceration and thrombosis [33] and mortality in HIV-positive patients [34]. All of these factors (activation of lymphocytes and macrophages) are modified in chronic infection HIV [35], which may account for the high percentage levels of cytokines demonstrated here (IL-6 and IFN-gamma) and the lack of association of myocardial of disease biomarkers (troponin, LDH and CPK) observed here.

The activity of enzymes E-NTPDase and E-5'-nucleotidase were not changed when incubated with different drugs of antiretroviral therapy on platelets *in vitro*. Similar results were obtained in an earlier study on peripheral lymphocytes of human blood, where ATP hydrolysis was not affected by the addition of zidovudine at the concentrations tested. In addition, there were no significant alterations in the hydrolysis when didanosine or lamivudine were used. The same was observed regarding ADP hydrolysis [36].

It should be noted that ectoenzymes purinergic system have been revealed to play a major role in the hydrolysis of nucleosides and adenine nucleotide platelet [37], which interferes with the signaling cells to stimulate the changes of the coagulation parameters and, thus, mitigate the effects procoagulant in HIV positive patients.

Cardiac changes in infectious diseases may arise with systolic dysfunction, due to the deterioration of cardiomyocytes gradually and also the aggression of viral capsids on the plasma membrane of these cells (cardiomyocytes) with consequent release of CK-MB and other enzymes to light the vessel [38]. Our results indicated no change in the levels of CK-MB or troponin and this data can support the idea of absence of cardiac damage in this group.

However, the exaggerated and persistent response of proinflammatory cytokines may contribute to target organ lesions, leading to multiple organ failure. The results of CRP support a proinflammatory status in HIV-positive patients, revealing the importance of further studies in relation to inflammatory mechanisms and cardiovascular risk. This study suggests that the changes in some inflammatory markers could indicate possible therapeutic targets in the management of HIV.

Therefore, changes in serum levels inflammatory and cardiac markers indicate a pro-inflammatory state. The *in vitro* activity of the studied ectoenzymes have not changed in platelets on the effect of antiretroviral drugs.

**Disclosure of conflicts of interests:** *Author declares there are no actual or potential conflicts of interest.*

TABLE 1

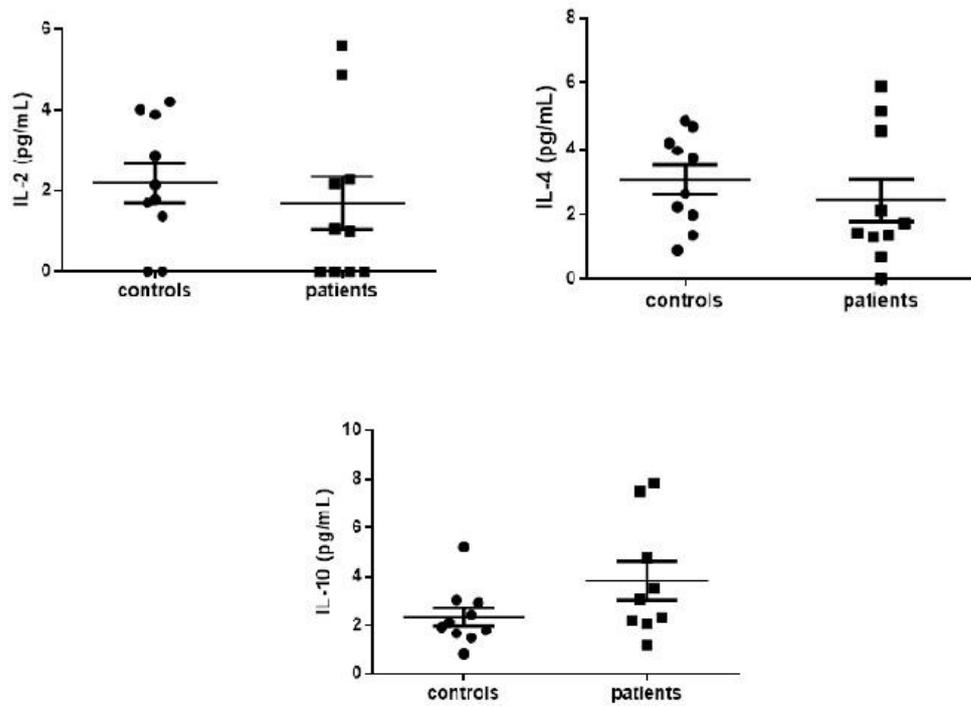
## TABLE

## CARDIAC MARKERS OF HIV-POSITIVE PATIENTS ON ANTIRETROVIRAL THERAPY (N = 10).

PATIENT	CPK (U/L)	CPK -MB (U/L)	TROPONIN (ng/mL)	DHL (U/L)	PCR (mg/L)
1	80	16	Negative	265	40,5*
2	67	6	Negative	252	42,1*
3	71	9	Negative	280	1,2
4	82	13	Negative	260	2,8
5	38	4	Negative	257	3,1
6	49	6	Negative	222	4
7	62	9	Negative	225	1,4
8	67	11	Negative	290	74,6*
9	49	2	Negative	295	2,2
10	58	4	Negative	246	39,6*

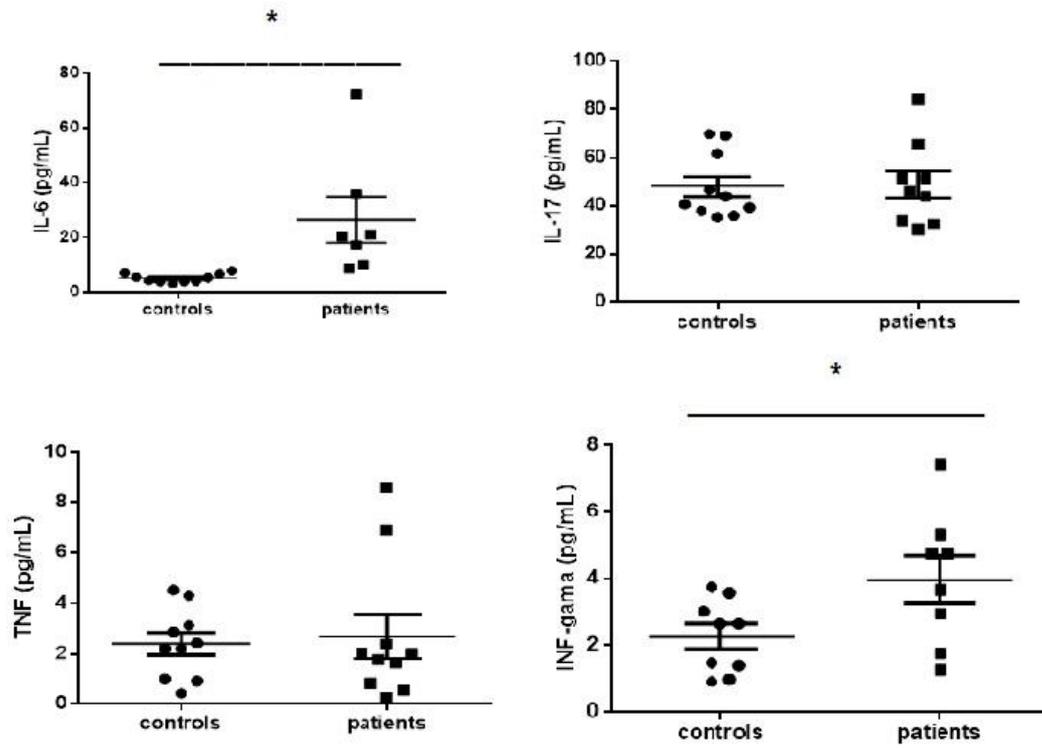
**Reference values:** CPK: 26- 189 U/L. CPK-MB: 0 -25 U/L. Troponin: < 0,5 ng/mL. DHL: 200-480 U/L. PCR: 0- 6 mg/L. \* Values above the reference value

FIGURE 1



**Figure 1:** Anti-inflammatory cytokines (IL-2, IL-4 and IL-10) of healthy volunteers and HIV-positive patients. There was no difference from control group (T test ;  $P > 0.05$ )

FIGURE 2



**Figure 2:** Proinflammatory cytokines (IL-6, IL-17, TNF and IFN-gamma) of healthy volunteers and HIV-positive patients. The asterisk symbol (\*) represents statistical difference from control group (T test;  $P < 0.05$ )

## References

- [1] Fowkes FJ, Price JF, Fowkes FG. Incidence of diagnosed deep vein thrombosis in the general population: a system review. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 25 (2003) 1-5.
- [2] Klein SK, Slim EJ DE Kruif, MD, *et al.* Is chronic HIV infection associated with venous thrombotic disease? A systemic review. *Neth J Med*, 63 (2005) 129-136.
- [3] UNAIDS/WHO. Epidemiological Fact Sheets on HIV and AIDS. <http://www.unaids.org/>, 2008 (accessed 23.01.15).
- [4] Anderson DW, Virmani R. Emerging patterns of heart disease in human immunodeficiency virus infection. *Hum Pathol*, 21 (1990) 253-259.
- [5] Barbaro G, Barbarini G, Pellicelli AM. HIV-associated coronary arteritis in a patient with fatal myocardial infarction. *N Engl J Med*; 344 (2001) 1799-800.
- [6] Viraben R, Aquilina C. Indinavir-associated lipodystrophy. *AIDS*, 12 (1998) 37–39.
- [7] Behrens G, Dejam A, Schmidt H, Balks H, Brabant G, Korner T, *et al.* Impaired glucose tolerance, beta cell function and lipid metabolism in HIV patients under treatment with protease inhibitors. *AIDS*, 13 (1999) 63–70.
- [8] Page, C. P. Platelets as inflammatory cells. *Immunopharmacology*, 17, (1989) 51–59.
- [9] Weksler, B. B. Platelets. In *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*, Raven Press, (1992) 727–746.
- [10] Marcus, A. J. *et al.* Inhibition of platelet recruitment by endothelial cell CD39/ecto-ADPase: Significance for occlusive vascular diseases. *Italian Heart Journal*, 2 (2001) 824-830.
- [11] Birck, A. *et al.* Role of extracellular ATP metabolism in regulation of platelet reactivity. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 140 (2002) 166-175.
- [12] Marcus, A. J, M.J. Broekman, J.H.F. Drosopoulos, N. Islam, D.J. Pinsky, C. Sesti, *et al.* Heterologous cell-cell interactions: thromboregulation,

cerebroprotection and cardioprotection by CD39 (NTPDase-1). *J Thromb Haemost*, 1(2003) 2497–2509.

[13] ROZALSKI, M, M. NOCUL, C. WATALA. Adenosina diphosphate receptors on blood platelets – potential new targets for antiplatelet therapy. *Acta Biochim Pol*, 52, (2005) 411–415.

[14] Bours, M, E.L.R. Swennen, F. DI Virgilio, B.N. Cronstein, P.C. Gagnelie. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Therap*, 112, (2006) 358–404.

[15] Barankiewicz, J, A.M. Danks, E. Abushanab, L. Makings, T. Wiemann, R.A. Wallis, et al. Regulation of adenosine concentration and cytoprotective effects of novel reversible adenosine deaminase inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther*, 283 (1997)1230–1238.

[16] Anfossi, G. I. Russo, P. Massucco, L. Mattiello, F. Cavalot, A. Balbo, et al. Adenosine increases human platelet levels of cGMP through role in this antiaggregating effect. *Thromb Res*, 105 (2002) 71–78.

[17] Fischer, D., M.B. Van Der Weyden, R. Snyderman, W.N. Kelley. A role for adenosine deaminase in monocyte maturation. *J Clin Invest*, 58 (1976) 399–407.

[18] Szychala, J. Tumor promoting functions of adenosine. *Pharmacol Therap*, 87 (2000)161–173.

[19] Gessi, K., S. Varani, S. Merighi. Adenosine and lymphocyte regulation. *Purinergic Signalling*, 3 (2007)109–116.

[20] Pilla, C.; Emanuelli, T.; Frassetto, S.S.; Battastini, A.M.O.; Dias, R.D.; Sarkis, J.J.F. ATP diphosphohydrolase activity (Apyrase, EC 3.6.1.5.) in human blood platelets. *Platelets*, 7 (1996) 225-230.

[21] Lunkes IG, Lunkes D, Stefanello F, Morch A, Morch MV, Mazzantti MC, Schetinger MCR. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in diabetes and associated pathologies. *Thrombosis Research*, 109 (2003) 189-194.

[22] Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72 (1976) 248-54.

- [23] Kedzierska, K., Crowe, S. M., Turville, S, Cunningham, A. L. *The influence of cytokines, chemokines and their receptors on HIV-1 replication in monocytes and macrophages.* Rev. Med. Virol, 13 (2003) 39.
- [24] Hunt PW, Martin JN, Sinclair E, et al. T cell activation is associated with lower CD4+ T cell gains in human immunodeficiency virus-infected patients with sustained viral suppression during antiretroviral therapy. *J Infect Dis*, 15 (2003) 1534–1543.
- [25] Giorgi JV, Hultin LE, Mckeating JA, et al. Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. *J Infect Dis*, 179 (1999) 859–870.
- [26] Anthony KB, Yoder C, Metcalf JA, et al. Incomplete CD4 T cell recovery in HIV-1 infection after 12 months of highly active antiretroviral therapy is associated with ongoing increased CD4 T cell activation and turnover. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 33 (2003) 125–133.
- [27] Connolly NC, Riddler SA, Rinaldo CR. Proinflammatory cytokines in HIV disease-a review and rationale for new therapeutic approaches. *AIDS Rev*, 3 (2005) 168–180.
- [28] Lederman MM, Calabrese L, Funderburg NT, et al. Immunologic failure despite suppressive antiretroviral therapy is related to activation and turnover of memory CD4 cells. *J Infect Dis*, 15 (2011) 1217–1226.
- [29] Stefano DE Servi, MD; Matteo Mariani, MD; Giuseppe Mariani, MD; Antonino Mazzone, MD. C-Reactive Protein Increase in Unstable Coronary Disease. *J Am Coll Cardiol*, 46 (2005) 1496-1502.
- [30] Loria V, Dato I, Graziani F, Biasucci LM. Myeloperoxidase: a new biomarker of inflammation in ischemic heart disease Sorg, O. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? *C R Biol*, 7 (2004) 649-62.
- [31] Volp ACP, Alfenas RCG, Costa NMB, et al. Capacidade dos biomarcadores inflamatórios em prever a síndrome metabólica. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 3 (2008) 537-549.
- [32] Le HV, Ramanathan L, Labdon JE, Mays-ichinco CA, Syto R, Arai N, et al. Isolation and characterization of multiple variants of recombinant human interleukin 4 expressed in mammalian cells. *J Biol Chem*, 263 (1988) 10817-10823.

- [33] Libby P, Sukhova G, Lee RT, Galis ZS. Cytokines regulate vascular functions related to stability of the atherosclerotic plaque. *J Cardiovasc Pharmacol*, 25 (1995) 9-12.
- [34] Mangili A, Polak JF, Quach LA, Gerrior J, Wanke CA. Markers of atherosclerosis and inflammation and mortality in patients with HIV infection. *Atherosclerosis*, 214 (2011) 468-73.
- [35] D'ettore G, Paiardini M, Ceccarelli G, Silvestri G, Vullo V. HIV-associated immune activation: from bench to bedside. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 27 (2011) 355-64.
- [36] Leal, D. B. R.; Schetinger, Maria R.C. ; Leal, C. A.M. ; Bertoncheli, Claudia de M. ; Morsch, Vera M. . NTPDase activity in human lymphocytes is not affected by therapeutic doses of anti-HIV drugs. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, (2011) 594-596.
- [37] **Rezer, J. F. P.**; Souza, Viviane C.G. ; Thorstemberg, M. L. ; Ruchel, J. B. ; Bertoldo, T. M. ; ZANINI, D. ; SILVEIRA, K. L. ; Leal, C.A.M. ; Passos, D. ; Gonçalves, J.F. ; Abdalla, F. H. ; Schetinger, M. R. C. ; Leal, D. B. R. . Effect of antiretroviral therapy in thromboregulation through the hydrolysis of adenine nucleotides in platelets of HIV patients. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 79, (2016) 321-328.
- [38] Jones, M.G. ; Swaminathan. Clinical chemistry creatine kinase. *Journal of Clinical Analysis*, 23 (1990) 82-86.

## DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou em plaquetas o envolvimento de ectoenzimas responsáveis pelo metabolismo do ATP e os perfis inflamatório, cardíaco e lipídico de pacientes HIV positivos. Considerando que, atualmente, um dos maiores desafios na área de HIV/AIDS é compreender a ativação imunológica persistente, a inflamação crônica e os mecanismos que influenciam no desenvolvimento das doenças cardiovasculares.

Apesar das vantagens da terapia antirretroviral (TARV) em longo prazo, como os benefícios clínicos (principalmente o controle da carga viral), o início do seu uso tem ocorrido cada vez mais rápido. Devido a este fato, percebe-se a ocorrência precoce de eventos adversos causados pela TARV como, citotoxicidade e transtornos metabólicos (FIDLER et al., 2008).

Neste cenário, o aumento do risco cardiovascular em indivíduos HIV positivos é evidente e esta relacionado a inúmeros fatores, incluindo alterações no perfil lipídico e a indução de alterações vasculares.

Dados da literatura, relatam que o uso da TARV pode potencializar a dislipidemia, caracterizada principalmente pela redução do HDL-colesterol, níveis elevados de triglicerídeos, elevação do colesterol total e de LDL-colesterol plasmáticos. Neste ponto, estas alterações no perfil lipídico estão em consonância com nosso estudo, já que, foram observados o aumento nos níveis séricos do colesterol total, aumento do colesterol LDL, redução do colesterol HDL e aumento de triglicerídeos. Estudos anteriores, relatam que a dislipidemia encontrada nos indivíduos HIV positivos, geralmente é do tipo mista, caracterizada por níveis de triglicerídeos notavelmente elevados, aumento de colesterol total e de colesterol plasmáticos e redução de HDL (HEATH et al., 2000; PENZAK & CHUCK et al., 2000; HAERTER et al., 2004).

Além disso, os achados deste estudo relacionados as alterações no perfil lipídico, podem estar ocorrendo não só pelo HIV e pela TARV, mas também pelo o estilo de vida e os hábitos alimentares de cada indivíduo. Já que, ainda não está estabelecido se a dislipidemia ocorre por um efeito direto da TARV ou se é resultado da interação entre vários outros fatores como: a predisposição genética, fatores ambientais como dieta e exercício físico ou outros fatores como a resposta do hospedeiro à infecção pelo HIV (MASIÁ-CANUTO et al., 2006).

Relata-se que a própria infecção pelo HIV pode induzir à disfunção endotelial (CHI, 2000), aumentar o nível da proteína C reativa, contribuindo para a aceleração da aterosclerose (HUI, 2003), e propiciar a apoptose de células endoteliais (SUDANO, 2006). Nossos achados estão de acordo com estes autores, os níveis séricos de proteína C reativa, também estavam aumentados nos pacientes aqui investigados, suportando a ideia de perfil pró-inflamatório durante a infecção.

Outro ponto relevante é que um dos mecanismos que participam da ativação imune e inflamação, é o desequilíbrio homeostático do tecido linfóide associado ao intestino (GALT), o qual promove ruptura da barreira epitelial e a translocação microbiana para a circulação, aferida pelas dosagens de lipopolissacarídeo (LPS) e CD14 solúvel (sCD14), entre outros marcadores (APPAY & SAUCE, 2008; REDHAGE et al., 2009; REUBEN et al., 2013; HSU et al., 2013; COWELL et al., 2015). Essa ativação imune, que pode ser desencadeada via toll like receptors (TLRs), ativa o fator de transcrição NFκB, que irá transcrever citocinas e outros produtos inflamatórios, tais como, IL-6, IL-8, HMGB1 (high mobility group box protein-1) e aumenta a expressão de RAGE (receptor for advanced glycation end products) e outros receptores na membrana celular (BRENCHLEY et al., 2006; YOUNG et al., 2008; KALEA et al., 2009).

As disfunções vasculares ocorrem devido a distúrbios no fluxo vascular, ou devido a fatores pró-aterogênicos, tais como lipoproteínas modificadas ou a presença de citocinas pró-inflamatórias (LIBBY, 2010). Com isso, observa-se que nossos resultados, revelam o aumento nos níveis plasmáticos de IL-6 e INF-gamma, que são citocinas pró-inflamatórias e estas podem estar envolvidas como resposta do organismo frente às disfunções vasculares.

Além disso, vale destacar que um estudo de Bilbis e colaboradores (2010), revelam que parâmetros de inflamação como D- dímero, PCR e IL-6 estão envolvidos na mortalidade de indivíduos HIV positivos, e nota-se que nossos resultados demonstram alterações em PCR e IL-6. Estes e outros parâmetros relacionam-se, também, ao aparecimento de outras doenças, independentemente da infecção pelo HIV ou como consequência do envelhecimento precoce. Por exemplo, hepatopatias, doença renal crônica,

diabetes mellitus alterações ósseas e neoplásicas, e doença de Alzheimer e Parkinson (LORD & ASHWORTH, 2012).

Estudos relatam que as células endoteliais tem papel importante na geração da resposta inflamatória contra estímulos nocivos circulatórios, tais como colesterol, produtos derivados do tabaco ou agentes infecciosos (STEIN, 2001). Destaca-se que os níveis de colesterol nos pacientes HIV positivos, mostraram-se elevados, neste sentido, podemos sugerir um possível dano no endotélio como resposta ao estímulo dos níveis elevados de colesterol circulantes.

O endotélio estaria atuando na linha de frente do mecanismo de defesa contra o desenvolvimento da lesão vascular, exercendo sua ação protetora através da modulação do tônus vascular, da estrutura vascular e da interação com componentes sanguíneos, sendo a disfunção endotelial um evento chave para o início e a progressão da doença vascular aterosclerótica (WANG, 2007).

Os produtos finais de glicação avançada (AGEs) são resultados de reações não enzimáticas entre açúcares redutores e componentes celulares, incluindo proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos que podem se acumular no tecido vascular. Tais produtos interagem com seus receptores (RAGE), membros da superfamília das imunoglobulinas que estão expressos na membrana de vários tipos celulares. A expressão de RAGE aumenta em consequência do acúmulo de seus ligantes, como AGE, HMGB1 (high mobility group box protein 1) e mediadores inflamatórios (SANDLER ET AL., 2011). Quando essa ligação entre produtos e receptor acontece, vias celulares pró-inflamatórias e pró-coagulantes são ativadas, o que aumenta a produção de moléculas de adesão, de citocinas inflamatórias como a interleucina 6 (IL-6).

Neste sentido, vale destacar, que vários hormônios e citocinas interferem no desenvolvimento dos megacariócitos, como eritropoetina e interleucinas 3 (IL-3), 6 (IL-6) e 11 (IL-11) (KAUSHANSKY, 1995). De acordo com isso, a influência da IL-6 no desenvolvimento de megacariócitos pode ser sugerida em nosso estudo, já que observamos aumento dos níveis séricos de IL-6 e também aumento da agregação plaquetária. Essa maior agregação plaquetária, poderia estar acontecendo, para compensar a disfunção do endotélio vascular, objetivando reparar a lesão endotelial causada pelos níveis elevados de colesterol total, LDL e triglicérides.

Outros autores também relatam aumento no perfil de agregação plaquetária em condições patológicas inflamatórias como a artrite reumatóide (BECKER et al., 2010) e distinto do nosso resultado, uma diminuição na agregação plaquetária em condições parasitárias como na doença de chagas (SOUZA et al., 2012).

Nossos dados, ao revelarem, uma excessiva agregação plaquetária, podem sugerir esses efeitos na vasculatura danificada como uma consequência não só do colesterol, mas também do processo inflamatório desencadeado na infecção pelo HIV e indicado pelo aumento dos níveis séricos de IL-6, IFN-gamma e PCR..

Levando em consideração toda a sinalização purinérgica e o controle dos níveis extracelulares dos nucleotídeos da adenina pelas ectoenzimas, observamos que a TARV foi capaz de manter os níveis extracelulares de ATP e AMP em condições fisiológicas. No entanto, revelou envolvimento no processo pró-coagulante, por diminuir a hidrólise do ADP e aumentar a agregação plaquetária. A diminuição da atividade da E-NTPDase, sugere níveis elevados de ADP extracelular que é um potente indutor de agregação plaquetária.

O nucleotídeo ADP no meio extracelular atua como mediador primário da ativação plaquetária, contribuindo para homeostasia e formação de trombos, através do seu efeito agregatório após danos teciduais. Tanto o perfil pró-inflamatório com a secreção aumentada de IL-6 e PCR e ainda a redução na atividade da E-NTPDase para a hidrólise do ADP, são capazes de evidenciar que os pacientes HIV positivos estão com um perfil pró- agregante, o qual pode desencadear ou acelerar o desenvolvimento das doenças cardiovasculares, ainda mais com as alterações nos níveis de lipídios circulantes observados.

Em relação ao grupo HIV que não fazia uso de terapia antirretroviral, verificou-se que a hidrólise de ATP e ADP são aumentados, sugerindo a presença de baixos níveis de ATP e ADP extracelular. Vale destacar que, durante situações de estresse metabólico, a libertação de ATP intracelular seguida por catabolismo deste nucleótido é a fonte mais importante para o aumento nos níveis de adenosina extracelular. Com a diminuição da atividade da E-ADA no grupo sem tratamento, sugere-se maior concentração de adenosina extracelular para minimizar os danos causados pelo HIV, a partir de seus efeitos cardioprotetores e vasodilatadores.

Somado a isso, Souza e colaboradores (2012), também encontraram uma diminuição da atividade da E-ADA em plaquetas de pacientes com a forma indeterminada da doença de Chagas. Estes achados podem representar um mecanismo dinâmico do organismo, a fim de preservar os níveis de adenosina no ambiente extracelular. Desta forma, a ação cardioprotetora da adenosina (KITAKAZE et al., 1999) minimizaria as alterações estruturais e funcionais na microvasculatura coronariana, as quais são responsáveis pela isquemia e necrose focal, permitindo que os pacientes permaneçam assintomáticos, sem alteração nos níveis séricos de troponina e CK-MB, justificando nossos achados em relação aos marcadores cardíacos específicos de miocárdio.

Sabe-se que a CD39 (E-NTPDase) é uma proteína de membrana que hidrolisa um fosfato do ATP, convertendo-o em ADP. Este também é responsável pela hidrólise do ADP, reduzindo-o a AMP. A CD73 (E-5'-nucleotidase) é uma glicoproteína que completa o ciclo de degradação, hidrolisando até AMP e reduzindo-o a adenosina. Esses receptores são os responsáveis por degradar ATP, ADP e AMP no meio extracelular. Estas moléculas são liberadas no meio extracelular via canais de panexinas, lise ou danos celulares, o que desencadeia o processo inflamatório. Estes receptores são considerados as maiores ectoenzimas metabolizadoras de nucleotídeos. Diante disso, consta-se um aumento na expressão da CD39 observado em plaquetas de pacientes diabéticos/hipertensos e pacientes com doença de Chagas (LUNKES et al., 2008; SOUZA et al., 2012). Porém, em nosso estudo, nos pacientes HIV positivos, não foram detectadas alterações na expressão destas ectoenzimas em plaquetas.

Diante das vastas especulações sobre o efeito da TARV e sua relação com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, ao avaliarmos o efeito *in vitro* dos antirretrovirais na atividade da E-NTPDase e E-5'-nucleotidase em plaquetas, não foi observada alteração na hidrólise dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP. Resultados semelhantes foram obtidos no estudo de Leal e colaboradores (2011), que não identificaram alterações na atividade destas enzimas *in vitro* em linfócitos humanos.

A compreensão do risco de doença cardiovascular nos indivíduos com HIV é complexa. Desde a introdução da TARV, eventos de complicações cardiovasculares ateromatosas têm sido relatados, porém não se sabe o quanto deste risco é atribuível à terapia e seus efeitos adversos ou mesmo a fatores genéticos, fatores de risco tradicionais ou, ainda, ao estado inflamatório associado ao HIV (ABERG, 2009).

Vale destacar que o risco de doença cardiovascular em pessoas vivendo com HIV/AIDS (PVHA), já é normatizado pelo ministério da saúde e recomenda-se que esse risco, seja avaliado em todas as PVHA na abordagem inicial e a cada mudança na TARV, por meio da escala de risco de Framingham (BRASIL, 2016).

Apesar disso, o conjunto destes resultados são muito importantes do ponto de vista subclínico, uma vez que, sugerem que o tratamento antirretroviral exerce importante influência, tanto na atividade das ectoenzimas do sistema purinérgico, quanto no perfil de agregação plaquetária, nos níveis séricos de colesterol e triglicérides e no perfil de citocinas inflamatórias, estes dados sugerem um dano acentuado ao endotélio vascular, que pode culminar no desenvolvimento da aterosclerose.

Estes parâmetros aqui relatados, podem ser úteis na identificação do risco cardiovascular, no monitoramento da patologia e no acompanhamento da evolução do tratamento antirretroviral no seu uso crônico.

Salienta-se, a importância da prevenção das doenças cardiovasculares atualmente prevalentes nos pacientes HIV positivos, controlando periodicamente a pressão arterial, o tabagismo, o diabetes, a dislipidemia, o sobrepeso, visto que, podem resultar no aparecimento de síndrome metabólica, relacionados com alterações inflamatórias e enzimáticas que podem influenciar no desenvolvimento de cardiopatias.

## **5. CONCLUSÕES**

- Alterações em ectoenzimas (E-NTPDase, E-5'-nucleotidase e E-ADA) nas plaquetas dos pacientes HIV positivos com e sem tratamento foram observadas. A infecção pelo HIV e o uso da TARV foram capazes de alterar a atividade da E-NTPDase, tanto para a hidrólise do ATP quanto do ADP nas plaquetas dos pacientes. Com isso, sugere-se que a cascata purinérgica está agindo para a formação do nucleosídeo adenosina.
- A atividade da E-NTPDase para hidrólise do ATP e a atividade da E-5'-nucleotidase para a hidrólise do AMP não foi alterada no grupo de pacientes sob uso de TARV. Estes dados demonstram que a terapia antirretroviral é capaz de manter os níveis de ATP e AMP em condições fisiológicas.
- Em plaquetas a atividade da E-ADA de pacientes HIV em tratamento com TARV, mostrou-se diminuída em relação aos pacientes controles. Isto sugere que as concentrações de adenosina poderiam estar elevadas. Fato que pode estar ocorrendo para que a adenosina exerça seus efeitos vasodilatadores e cardioprotetores, diante do risco cardiovascular nos pacientes que fazem uso de TARV ou exerça seus antiinflamatórios nos pacientes que não faz o uso da TARV.
- O uso de TARV alterou o perfil lipídico, indicado pelas alterações dos níveis séricos de colesterol HDL (redução), colesterol LDL (aumento) e triglicerídeos (aumento). Estas alterações podem indicar um elevado risco para o desenvolvimento de doença cardiovascular.
- A expressão de CD39 (E-NTPDase) e CD73 (E-5'-nucleotidase) em plaquetas de pacientes HIV positivos que fazem uso de TARV não está alterada.
- A TARV, revelou estar envolvida no processo pró-coagulante, por diminuir a hidrólise do ADP e aumentar a agregação plaquetária,

sugerindo um risco maior de eventos tromboembólicos e cardiovasculares.

- Observou-se um perfil pró-inflamatório nos pacientes estudados, indicados pelo aumento dos níveis séricos de IFN-gamma e IL-6.
- Níveis séricos de Proteína C reativa estão alterados em relação aos outros marcadores cardíacos testados (CK, CK-MB, troponina e DHL), corroborando para o perfil pró-inflamatório e risco cardiovascular.
- A TARV não alterou a atividade da E-NTPDase e da E-5'-nucleotidase em plaquetas *“in vitro”*
- Por fim, sugere-se que a interação entre os parâmetros aqui relatados, possam servir como futuras estratégias no controle das doenças cardiovasculares em pacientes HIV positivos, ou ainda, retardar o aparecimento de comorbidades não associadas ao HIV/AIDS, tais como distúrbios metabólicos, tromborregulatórios e o desenvolvimento das doenças cardiovasculares.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABERG JA. Cardiovascular Complications in HIV Management: Past, Present, and Future, **JAIDS** 2009;50(1):54. 64.

ADELMEGUID AE, TOPOL EJ. The myth of the myocardial infarctlet during percutaneous revascularization procedures. **Circulation**. 1996; 94: 3369 – 75. 2.

ALVES-FERREIRA, M.; DUTRA, P.M.; LOPES, A.H.; FERREIRA-PEREIRA, A.; SCOFANO, H.M.; MEYER-FERNANDES, J.R. Magnesium-dependent ecto-ATP diphosphohydrolase activity in *Herpetomonas muscarum muscarum*. **Current Microbiology**, v. 47, p. 265-271, 2003.

ANDERSON DW, VIRMANI R. Emerging patterns of heart disease in human immunodeficiency virus infection. **Hum Pathol**, v.21: p.253-259, 1990.

APPAY V, SAUCE D. Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. **J Pathol** 2008; 214: 231-241.

APOSTOLOVA N; GARCIA, A. B, ESPLUGUES. Mitochondrial interference by anti-HIV drugs: mechanisms beyond Pol-γ inhibition. **Trends in pharmacological sciences**. v. 32: p.715-725, 2011.

BAKKER, W. W. et al. Platelets and ectonucleotidases. **Platelets**, v. 5, p. 121-129, 1994.

BALASUBRAMANYAN A, SEKHAR RV, JAHOR F, et al. Pathophysiology of dyslipidemia and increased cardiovascular risk in HIV lipodystrophy: A model of "systemic steatosis". **Curr Op Lipidol** 2004;15:59-67.

BARBARO G, BARBARINI G, PELLICELLI AM. HIV-associated coronary arteritis in a patient with fatal myocardial infarction. **N Engl J Med**; v. 344, p.1799-800, 2001.

BARTLETT JG AND MOORE R. A comprehensive plan for managed care of patients infected with human immunodeficiency virus. **Clin. Infect. Dis.** 29(1):50-55, 1999.

BATTEGAY M & ETZI L. Morbidity and mortality in HIV infected individuals – a shift towards co-morbidities. **Swiss Med Weekly**, v. 139, p. 564. 70, 2009.

BECKER LV, ROSA CS, SOUZA VDO C, BAGATINI MD, CASALI EA, LEAL CA, DA SILVA JC, MORETTO MB, PINHEIRO FDE V, MORSCH VM, SCHETINGER MR, LEAL DB. Activities of enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from patients with rheumatoid arthritis. **Clin Biochem**. 2010 Sep;43(13-14):1096-100.

BEHRENS G, DEJAM A, SCHMIDT H, BALKS H, BRABANT G, KORNER T, et al. Impaired glucose tolerance, beta cell function and lipid metabolism in HIV patients under treatment with protease inhibitors. **AIDS** 1999, 13:63–70.

BERMUDES, D.; PECK, K.R.; AFIFI, M.A.; BECKERS, C.J.; JOINER, K.A. Tandemly repeated genes encode nucleoside triphosphate hydrolase isoforms secreted into the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 269, p. 29252-29260, 1994

BERRÊDO-PINHO, M.; PERES-SAMPAIO, C.E.; CHRISPIM, P.P.; BELMONT-FIRPO, R.; LEMOS, A.P.; MARTINY, A.; VANNIER-SANTOS, M.A.; MEYER-FERNANDES, J.R. A Mg-dependent ecto-ATPase in *Leishmania amazonensis* and its possible role in adenosine acquisition and virulence. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 391, p. 16-24, 2001.

BRENCHLEY JM, PRICE DA, SCHACKER TW, ASHER TE, SILVESTRI G, RAO S, et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med* 2006; 12(12): 1365 - 1371.

BILBIS LS, IDOWU DB, SAIDU Y, LAWAL M, NJOKU CH. Serum levels of antioxidant vitamins and mineral elements of human immunodeficiency virus positive subjects in Sokoto, Nigeria. *Ann Afr Med* 2010; 9(4): 235 -239.

BURNSTOCK , G. Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol. Life Sci.* V. 64, n. 12, p. 1471- 1483; 2007.

BIRCK, A. et al. Role of extracellular atp metabolism in regulation of platelet reactivity. *Journal of laboratory and clinical medicine*, v. 140, p. 166-175, 2002.

BOROWIEC, A.; LECHWARD, K.; TKACZ-STACHOWSKA, K.; SKLADANOWSKI, A.C. Adenosine as a metabolic regulator of tissue function: production of adenosine by cytoplasmic 5'-nucleotidases. *Acta Biochimica Polonica*, v. 53, p. 269-278, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portal sobre AIDS, doenças sexualmente transmissíveis e hepatites virais. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/>. Acesso em 24/10/2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portal sobre AIDS, doenças sexualmente transmissíveis e hepatites virais. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/>. Acesso em 16/03/2016.

BOURS, M.J.; SWENNEN, E.L.; DI VIRGILLIO, F.; CRONSTEIN, B.N. ; DABNELIE, P.C. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 112, p. 358-404, 2006.

CALIFF RM, ABDELMEGUID AE, KUNTZ RE, et al. Myonecrosis after revascularization procedures. *J Am Coll Cardiol.* 1998; 31:241-51. 3.

CALZA L, MANFREDI R, CHIODO F. Statins and fibrates for the treatment of hyperlipidaemia in HIV-infected patients receiving HAART. **AIDS** 2003, 17:851–859.

CARR A. HIV protease inhibitor - Related lipodystrophy syndrome. **Clin Infect Dis** 2000;30(suppl. 2):5135-42.

CASTRO, H.C.; FERREIRA, B.L.A.; NAGASHIMA, T.; SCHUELER, A.; RUEFF, C.; CAMISASCA, D.; MOREIRA, G.; SCOVINO, G.; BORGES, L.; LEAL, M.; FIGUEIRA, M.; PASCHOAL, P.; BERNARDO, V.; BOURGUINHON, S.; RODRIGUES, C.R.; SANTOS, D.O. Plaquetas: ainda um alvo terapêutico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, p. 321-332, 2006.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Pneumocystis pneumonia. Los Angeles, 1981. Disponível em <[http://www.cdc.gov/preview/mmwrhtml/june\\_5.htm](http://www.cdc.gov/preview/mmwrhtml/june_5.htm)> Acesso em 20 de fevereiro de 2015.

CENTEMERO M, ABIZAID A, MALDONADO G, ZAGO A, SOUSA A. O impacto da utilização dos stents na prática de cardiologia intervencionista: houve mudança na última década? **Rev. Soc. Cardiol. Estado São de Paulo**. 2000; 10 (supl. B): 15. 5.

CHIU, I. M. et al. Nucleotide-sequence evidence for relationship of aids retrovirus to lentiviruses. **Nature**, v. 317, n. 6035, p. 366-368, 1985.

CHI D; HENRY J; KELLEY J; et al. The effects of HIV infection on endothelial function. **Endothelium**, v. 7, p. 223-242, 2000.

CHAMPAGNE, P., et al. Skewed maturation of memory HIV - specific CD8 T lymphocytes. **Nature**. 2001, 410:106 – 11.

COHEN, M. S.; CHEN, Y. Q.; MCCAULEY, M. et al. Prevention of HIV-1 Infection with Early Antiretroviral Therapy 2011. **N. Engl. J. Med**, [S.l.], v. 365, p. 493-505.

COWELL A, SHENOI SV, KYRIAKI DES TC, FRIEDLAND G, BARAKAT LA. Trends in hospital deaths among human immunodeficiency virus–infected patients during the antiretroviral therapy era, 1995 to 2011. 2015; 10(9): 608-614.

De JESUS, J.B.; DE SÁ PINHEIRO, A.A.; LOPES, A.H.; MEYER-FERNANDES, J.R. An ectonucleotide ATP-diphosphohydrolase activity in *Trichomonas vaginalis* stimulated by galactose and its possible role in virulence. **Zeitschrift Für Naturforschung C, Journal of Biosciences**, v. 57, p. 890-896, 2002.

DI VIRGILIO, F. et al. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. **Blood**, v.97, n.3, p.587-600, 2001.

D'SOUZA WN, CHANG CF, FISCHER AM, LI M, HEDRICK SM. The Erk2 MAPK regulates CD8 T cell proliferation and survival. *J. Immunol.* 2008, 181:7617 – 29.

ELEOPULOS, E.P.; *et al.* A critique of the Montagnier evidence for the HIV/AIDS hypothesis. *Medical Hypotheses*. v. 63: p. 597-601, 2004.

FAUCI, A . The AIDS epidemic. Considerations for the 21<sup>a</sup> century. *N.Engl. J. Med.* V. 341, p. 1046-1050, 1999.

FIDLER S, FOX J, PORTER K, WEBER J. Primary HIV infection: to treat or not to treat? *Curr Opin Infect Dis.* 2008, 21:4-10.

FIETTO, J.L.R.; DEMARCO, R.; NASCIMENTO, I.P.; CASTRO, I.M.; CARVALHO, T.M.; DE SOUZA, W.; BAHIA, M.T.; ALVES, M.J.; VERJOWSKI-ALMEIDA, S. Characterization and immunolocalization of an NTP diphosphohydrolase of *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 316, p. 454-460, 2004.

FILIPPINI, A.; TAFFS, R.E.; AGUI, T.; SITKOVSKY, M.V. Ecto-ATPase activity in cytolytic T-lymphocytes. Protection from the cytolytic effects of extracellular ATP. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 265, p. 334-340, 1990.

FOWKES FJ, PRICE JF, FOWKES FG. Incidence of diagnosed deep vein thrombosis in the general population: a system review. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, v. 25, p.1-5, 2003.

FRANCO, R.; CASADÓ, V.; CIRUELA, F.; SAURA, C.; MALLOL, J.; CANELA, E.I.; LLUIS, C. Cell surface adenosine deaminase: much more than na ectoenzyme. *Progress in Neurobiology*, v. 52, p. 283-294, 1997.

FROJMOVIC, M.M.; PANJWANI, R. Geometry of normal mammalian platelets by quantitative microscopic studies. *Biophysical Journal*, v. 16, p. 1071-1089, 1976.

GRINSPOON S, CARR A. Cardiovascular risk and body fat abnormalities in HIV infected adults. *N Engl J Med.* 2005; 352: 48-62.

GRUNFELD, C. *et al.* Contribution of metabolic and anthropometric abnormalities to cardiovascular disease risk factors. *Circulation*, [S.I.], v. 118, n. 2, p. e20-8, 2008.

HADIGAN C, MEIGS JB, WILSON PWF, *et al.* Prediction of coronary heart disease risk in HIV-infected patients with fat redistribution. *Clin Infect Dis* 2003;36:909-16.

HAERTER G, MANFRAS BJ, MUELLER M, *et al.* Regression of lipodystrophy in HIV-infected patients under therapy with the new protease inhibitor atazanavir. *AIDS* 2004;18(6):952-5.

HARTWIG, J.H. Platelet structure. In: MICHELSON, A. D. **Platelets**. California: Academic Press, 2002

HARKER, L.A.; FINCH, C.A. Thromkinetics in man. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 48, p. 963-974, 1969.

HASKÓ, G.; CRONSTEIN, B.N. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. **Trends in Immunology**, v. 25, p. 33-39, 2004.

HEATH KV, HOGG RS, CHAN KJ, HARRIS M, MONTESSORI V, O'SHAUGHNESSY MV AND MONTANER JSG. Lipodystrophy-associated morphological, cholesterol and triglyceride abnormalities in a population based HIV " AIDS treatment database. **AIDS** 2001; 15: 231-239.

HUI, DY. HIV protease inhibitors and atherosclerosis. **J Clin Invest**, v. 111, p. 317-318, 2003.

HOGG RS, O'SHAUGHNESSY MV, GATARAC N, et al. Decline in deaths from AIDS due to new antiretrovirals (letter). **Lancet**, v. 349, p.1294, 1997.

HOLMES DR JR, BERGER PB. Troponisms, Necrosottes, enzyme leaks, creatine phosphokinase bumps, and infarctlets-what's behind this new lexicon and what does it add? **Circulation**. 2001; 104: 627-29. 4.

HSUE, PRISCILLA Y; HUNT, PETER W; WU, YUANER; SCHNELL, AMANDA; HO, JENNIFER E; HATANO, HIROYU; XIE, YU; MARTIN, JEFFREY N; GANZ, PETER; DEEKS, STEVEN G. Association of abacavir and impaired endothelial function in treated and suppressed HIV infected patients. **AIDS**, v. 23, n. 15, p. 2021. 2027, 2009.

HSU DC, SERETI I, ANANWORANICH J. Serious Non-AIDS events: Immunopathogenesis and interventional strategies. **AIDS Res Ther** 2013; 10(1): 29.

INSIGHT START STUDY GROUP; LUNDGREN, J. D.; BABIKER, A. G.; GORDIN, F. et al. Initiation of Antiretroviral Therapy in Early Asymptomatic HIV Infection. **N. Engl. J. Med.**, [S.l.], v. 373, n. 9, p. 795-807, 27 ago. 2015.

KACSMARECK, E.; KOZIAK, K.; SÉVIGNY, J.; SIEGEL, J.B.; ANRATHER, J.; BEAUDOIN, A.R.; BACH, F.H.; ROBSON, S.C. Identification and characterization of CD39/vascular ATP diphosphohydrolase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 33116-33122, 1996.

KALEA AZ, SCHIMIDT AM, HUDSON BI. RAGE: a novel biological and genetic marker for vascular disease. **Clin Sci (Lond)** 2009; 116(8): 621 -637.

KARON JM, BUEHLER JW, BYERS RH, FARIZO KM, GREEN TA, HANSON DL, ROSENBLUM LS, GAIL MH, ROSENBERG PS, BROOKMEYER R. Projections of the number of persons diagnosed with AIDS and the number of

immunosuppressed HIV-infected persons- United States, 1992-1994. **MMWR Recomm Rep** 41(RR-18): 1-29, 1992.

KAUSHANSKY, K. Thrombopoietin: the primary regulator of platelet production. **Blood**, v. 86, p. 419-443, 1995

KEELE B. F. et al. Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. **Science**, v. 313, n. 5786, p. 523-526, 2006.

KLEIN SK, SLIM EJ, DE KRUIF MD, *et al.* Is chronic HIV infection associated with venous thrombotic disease? A systemic review. **Neth J Med**, v.63, p. 129-136, 2005.

KLIMAS, N.; KONERU, A. O.; FLETCHER, M. A. Overview of HIV. **Psychosom Med**, v. 70, n. 5, p. 523-30, 2008.

KOTTILIL S, GAMBERG J, BOWMER I, TRAHEY J, HOWLEY C, GALLANT M, *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 replication, immune activation, and circulating cytotoxic T cells against uninfected CD4+ T cells. **J Clin Immunol**. 2000, 20(3):175 – 86

KRAMER, A.; LAZZAROTTO, A.; SPRINZ, E.; MANFROI, W. Alterações Metabólicas, Terapia Antirretroviral e doença cardiovascular em idosos Portadores de HIV. Doença cardiovascular nos idosos portadores de HIV **Arq Bras Cardiol** 2009; 93(5) : 561-568

LAING RB, BRETTELE RP, LEEN CL. Venous thrombosis in HIV infection. **Int J STD AIDS**, v. 7, p. 82-85, 1996.

LIBBY P; DICARLI M; WEISSLEDER R. T. The Vascular Biology of Atherosclerosis and Imaging Targets *Journal of Nuclear Medicine* 51(1) 33. 37, 2010.

LIMA, V. D.; REUTER, A.; HARRIGAN, P. R. *et al.* Initiation of antiretroviral therapy at high CD4+ cell counts is associated with positive treatment outcomes. **AIDS**, v. 29, n. 14, p. 1871-82, 10 set. 2015.

LORD CJ, ASHWORTH A. The DNA damage response and cancer therapy. **Nature London** 2012; 481(7381): 287 - 294.

LORENZI, T.F.; AMICO, E.; DANIEL, M.M.; SILVEIRA, P.A.A.; BUCCHERI, V. **Manual de Hematologia Propedêutica e Clínica**. 3ª ed., Ed. Medsi, Rio de Janeiro, 2003.

LOUW S, JACOBSON BF, BULLER H. Human immunodeficiency virus infection and acute deep vein thrombosis. **Clin Appl Thromb Hemost**, v. 14, p. 352-355, 2008.

LUTHJE J, OGILVIE A. The presence of diadenosine 5'5''- p1,p3- triphosphate (Ap3A) in human platelets. **Biochem Biophys Res Com** 115: 235 – 260, 1983.

MACHADO, ARAÚJO, CARVALHO & CARVALHO. Mecanismos de resposta imunes à infecção. *An bras Dermatol*, Rio de Janeiro, 79(6):647-664, nov/dez. 2004.

MARCUS, A. J. et al. Inhibition of platelet recruitment by endothelial cell CD 39/ecto-ADPase: Significance for occlusive vascular diseases. *Italian Heart Journal*, v. 2, p. 824-830, 2001.

MARINS JRP, JAMAL LF, CHEN SY, et al. Dramatic improvement in survival among adult Brazilian AIDS patients. *AIDS*, v.17, p. 1675-1682, 2003.

MARTINEZ E, et al. Cardiovascular disease and HIV infection: host, virus or drugs? *Curr Opin Infect Dis*;2009;22:28. 34.

MASIÁ-CANUTO M, MORELL EB, RODERO FG. Alteraciones lipídicas y riesgo cardiovascular asociado a la terapia antirretroviral. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2006; 24 (10): 637-48.

MONTESSORI V, PRESS N, HARRIS M, et al. Adverse effects of antiretroviral therapy for HIV infection. *CMAJ* 2004;170(2):229-38.

MULLIGAN K, GRUNFELD C, TAI VW, ALGREN H, PANG M, CHERNOFF DN, et al. Hyperlipidemia and insulin resistance are induced by protease inhibitors independent of changes in body composition in patients with HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2000; 23: 35-43.

PACHECO AG; TUBOI, SH ; MAY, SB; MOREIRA, LFS; RAMA DAS, L; NUNES, EP; MERÇON, M; FAULHABER, JC; HARRISON, LH; SCHECHTER, M.. Increase in non AIDS related conditions causes of death among HIV infected individuals in HAART era in Brazil. *PLOS One* 2008;3:e1531.

PAGE, C. P. Platelets as inflammatory cells. *Immunopharmacology* v. 17, p. 51–59, 1989.

PENIDO, M.L.O.; RESENDE, D.M.; VIANELLO, M.A.; BORDIN, F.H.S.; JACINTO, A.A.; DIAS, W.D.; MONTESANO, M.A.; NELSON, D.L.; COELHO, P.M.Z.; VASCONCELOS, E.G. A new series of schistosomicide drugs, the alkylaminoalkanethiosulfuric acids, partially inhibit the activity of *Schistosoma mansoni* ATP diphosphohydrolase. *European Journal of Pharmacology*, v. 570, p. 10-17, 2007.

PENZAK SR, CHUCK SK. Hyperlipidemia associated with HIV protease inhibitor use: pathophysiology, risk factors and treatment. *Scand. J. Infect. Dis* 2000; 32: 111-123.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptores for purines and pyrimidines. *Pharmacological Reviews*, v. 50, p. 413-492, 1998.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Involvement of purinergic signaling in cardiovascular diseases. *Drug News & Perspectives*, v. 16, p. 133-140, 2003.

REDHAGE LA, SHINTANI A, HAAS DW, EMEAGWALI N, MARKOVIC M, OBOHO I, et al. Clinical factors associated with plasma F2-isoprostane levels in HIV-infected adults. *HIV Clin Trials*, 2009; 10(3): 181-192.

RESTA, R.; YAMASHITA, Y.; THOMPSON, L.F. Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD73. *Immunological Reviews*, v.161, p.95-109, 1998.

REUBEN L. SMITH, RICHARD DE BOER, STANLEY BRUL, YELENA BUDOVSKAYA, HANS VAN DER SPEK. Premature and accelerated aging: HIV or HAART? *Front Genet* 2013; 28.

SANDLER NG, WAND H, ROQUE A, et al. Plasma levels of soluble CD14 independently predict mortality in HIV infection. *J Infect Dis* 2011; 203(6): 780 - 790.

SCHAFER, A.I. Antiplatelet therapy. *The American Journal of Medicine*, v. 101, p. 199-209, 1996.

SHAROYAN, S.; ANTONYAN, A.; MARDANYAN, S.; LUPIDI, G.; CRISTALLI, G. Influence of dipeptidyl peptidase IV on enzymatic properties of adenosine deaminase. *Acta Biochimica Polonica*, v.53, p. 539- 546, 2006.

SLEASMAN, J.W.; GOODNOW, M.M. HIV-1 Infection, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 111, p.582 – 592, 2003.

SPOSITO AC, CAMELLI B, FONSECA FAH, BERTOLAMI MC. IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. *Arq Bras de Cardiol*, v. 88, p. 2-19, 2007.

SIGN (Scottish Intercollegiate Guidelines Network). Risk estimation and the prevention of cardiovascular disease:a national clinical guideline. 2007. [Cited in 2016 Jan 1]. Available from: <http://www.sign.ac.uk/pdf/sign97.pdf>

SMART/INSIGHT and the D:A:D Study Groups. Use of Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors and Risk of Myocardial Infarction in HIV infected Patients *AIDS* 2008, 22:F17. F24.

STAPRANS SI AND FEINBERG MB. The roles of nonhuman primates in the preclinical evaluation of candidate AIDS vaccines. *Expert. Rev. Vaccines*. 3(4) Suppl:S5-32, 2004.

STEIN, JH. Vascular age: integrating carotid intima media thickness measurements with global coronary risk assessment, *Clin Cardiol* 2004; 27(7):388. 92.

STONE WG, MEHRAN R, DANGAS G, LANSKY AJ, KORNOWSKI R, LEON MB. Differential impact on survival of eletrocardiographic Q-wave versus enzymatic myocardial infarction after percutaneous intervention. A device-specific analysis of 7147 patients. **Circulation**. 2001; 104: 642-7.

SUDANO. Cardiovascular disease in HIV infection. **Am Heart J** 2006; 151:1147. 55.

SULLIVAN PS, HANSON DL, CHU SY, JONES JL, WARD JW. 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, p. 301-8, 1998.

SULLIVAN P. Associations of anemia, treatments for anemias, and survival in patients with human immunodeficiency virus infection. **J Infect Dis**, v. 185, p. 138-42, 2002.

SWEET DE. Metabolic complications of antiretroviral therapy. **Top HIV Med**. 2005; 13 (2): 70-74.

TEBIT, D. M. et al. HIV diversity, recombination and disease progression: How does fitness "Fit" into the puzzle? **Aids Revivs**, v. 9, n. 2, p. 75-87, 2007.

THOMPSON, L.F.; RUEDI, J.M.; O'CONNOR, R.D.; BASTIAN, J.F. Ecto-5'-nucleotidase expression during human B cell development. An explanation for the heterogeneity in B lymphocyte ecto-5'-nucleotidase activity in patients with hypogammaglobulinemia. **Journal of Immunology**, v. 137, p. 2496-500, 1986.

UNAIDS/WHO Epidemiological Fact Sheets on HIV and AIDS, 2008 Update. [www.unaids.org](http://www.unaids.org) (acesso em 23 de janeiro de 2013).

UNAIDS. AIDS epidemic update. Disponível em <<http://www.unaids.org>>. Acesso em: 18 janeiro 2014.

VIRABEN R, AQUILINA C. Indinavir-associated lipodystrophy. **AIDS** 1998, 12:F37–F39.

NISOLE, S., A. SAIB. Early steps of retrovirus replicative cycle. **Retrovirology**, v.1, p. 9, 2004.

WANG X; CHAI H; YAO Q, CHEN C. Molecular mechanism of HIV protease Inhibitor Induceed endothelial dysfunction. **J Acquir Immune Defic Syndr** 2007;44(5):493. 99.

WEKSLER, B. B. Platelets. In *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*, **Raven Press**, p. 727–746, 1992.

WORM SW, SABIN C, WEBER R, REISS P, EL-SADR W, DABIS F, DE WIT S, LAW M, MONFORTE AD, FRIIS-MØLLER N, KIRK O, FONTAS E, WELLER I,

PHILLIPS A, LUNDGREN J, D:A:D. Study Group. Risk of Myocardial Infarction in Patients with HIV Infection Exposed to Specific Individual Antiretroviral Drugs from the 3 Major Drug Classes: The Data Collection on Adverse Events of Anti-HIV Drugs (D:A:D) Study. **Journal of Infectious Diseases** 201; 318-330, 29 Dec 2009.

YEGUTKIN, G.G. Nucleotide and nucleoside converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1783, p.673-694, 2008.

YOUN JH, OH YJ, KIM ES, CHOI JE, SHIN JS. High mobility group box 1 protein binding to lipopolysaccharide facilitates transfer of lipopolysaccharide to CD14 and enhances lipopolysaccharide-mediated TNF-alpha production in human monocytes. **J Immunol** 2008; 180(7): 5067 -5074.

ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. **Hematologia: Fundamentos e Prática**. 1ª ed., Editora Atheneu, São Paulo, 2004.

ZHANG, Z.; SCHULER, T.; ZUPANCIC, M.; WIETGREFE, S.; *et al.* Sexual transmission and propagation of SIV HIV in resting and activated CD4+ T cells. **Science**, v. 286, p. 1353 – 57, 1999.

ZIMMERMANN, H. Extracellular purine metabolism. **Drug Development Research**, v. 39, p. 337–352, 1996.

ZIMMERMANN, H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 362, p. 299-309, 2000.

ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases: some recent developments and note on nomenclature. **Drug Development Research**, v. 52, p. 44-56, 2001.

ZIMMERMANN, H, ZEBISCH M, STRÄTER N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. **Purinergic Signal**. Sep;8(3):437-502, 2012.

ZYBARTH G, REILING N, SCHMIDTMAYEROVA H, SHERRY B, BUKRINSKY M. Activation - induced resistance of human macrophages to HIV - 1 infection in vitro. **J Immunol**. 162:400– 6, 1999.

## **APÊNDICE**

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO (GRUPO CONTROLE)**

Título do projeto:

**MARCADORES INFLAMATÓRIOS, CARDÍACOS E EXPRESSÃO DE  
ECTOENZIMAS DO SISTEMA PURINÉRGICO EM PLAQUETAS DE  
PACIENTES HIV POSITIVOS**

Pesquisadora responsável: **Profa. Dra. Daniela Bitencourt Rosa Leal**

Instituição/Departamento : **Departamento de Microbiologia e Parasitologia–  
UFSM**

Telefone para contato: (55) 3220-9581 ou (55) 9105-4701

Comitê de Ética em Pesquisa: Av. Roraima,1000- Prédio da Reitoria-2º andar-  
sala Comitê de Ética -Campus Universitário- Bairro Camobi- 97105-900-  
UFSM-Santa Maria-RS

Tel: 0-xx-55 3220 9362

Local de coleta de dados: \_\_\_\_\_

Nome da paciente: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ anos

Responsável legal: \_\_\_\_\_

Objetivo do estudo/Riscos/Procedimentos/Benefícios/Sigilo:

O senhor está sendo convidado a participar de uma pesquisa, onde será colhido 15ml de sangue por punção venosa, a coleta será realizada no laboratório de pesquisa do departamento de parasitologia e microbiologia, prédio 20 da UFSM. Voluntariamente você poderá fazer parte do grupo controle deste projeto, para tanto, será necessário um exame de sangue para determinar a sua sorologia anti-HIV. Este exame irá confirmar se você é infectado pelo HIV ou não. Seu exame não terá custo pessoal, nós pesquisadores iremos custear o exame. **É fornecida uma cópia do TCLE ao participante da pesquisa.**

**Objetivo:** a pesquisa avaliará a atividade de algumas substâncias que compõem o sangue de pacientes com HIV, para melhor entendermos sobre o HIV e gerarmos informações capazes de futuramente auxiliar no controle e novos tratamentos, para isso precisamos de indivíduos saudáveis e com sorologia não reagente para anti-HIV, ou seja, indivíduos voluntários sem HIV.

**Procedimento e riscos:** Na coleta de sangue haverá o risco de um pequeno desconforto devido à picada da agulha, e do local da coleta ficar dolorido ou arroxeadado, voltando ao normal em poucos dias, não causando problemas a sua saúde.

**Benefícios:** os resultados não irão trazer benefícios diretos, porém sua contribuição é importante. Com esse estudo, poderemos aprimorar nossos conhecimentos sobre a evolução e tratamento da doença. Ao participar desta pesquisa o senhor não terá gasto ou lucro financeiro. Não será feito pagamento pela sua participação na pesquisa.

**Confidencialidade:** Em nenhum momento será revelado ou utilizado seu nome. Os dados serão arquivados por um período de 5 anos, e depois destruídos.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito deste estudo. Ficaram claros para mim quais são os objetivos deste estudo, os procedimentos a

serem realizados, seus desconfortos e riscos, assim como a garantia de que minhas informações serão preservadas. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo.

Santa Maria, ..... de .....de .....

---

Assinatura do sujeito de pesquisa/representante legal /marca datiloscópica  
N. identidade (para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste sujeito de pesquisa ou representante legal para a participação neste estudo.

Santa Maria, ..... de ..... de .....

---

Assinatura do responsável pelo estudo

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com os pesquisadores:

Daniela Bitencourt Rosa Leal: 55-3220-9581 –

João Felipe Peres Rezer: 55-8435-6438

Comitê de Ética em Pesquisa: Av. Roraima,1000-Prédio da Reitoria-2º andar-sala comitê de ética-Campus Universitário-Bairro Camobi -97105-900- Santa Maria- RS- Telefone: 0-xx-55-3220-9362

## **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO (GRUPO HIV+)**

Título do projeto:

**MARCADORES INFLAMATÓRIOS, CARDÍACOS E EXPRESSÃO DE  
ECTOENZIMAS DO SISTEMA PURINÉRGICO EM PLAQUETAS DE  
PACIENTES HIV POSITIVOS**

Pesquisadora responsável: **Profa. Dra. Daniela Bitencourt Rosa Leal**

Instituição/Departamento : **Departamento de Microbiologia e Parasitologia–  
UFSM**

Telefone para contato: (55) 3220-9581 ou (55) 9105-4701

Comitê de Ética em Pesquisa: Av. Roraima,1000- Prédio da Reitoria-2º andar-  
sala Comitê de Ética -Campus Universitário- Bairro Camobi- 97105-900-  
UFSM-Santa Maria-RS

Tel: 0-xx-55 3220 9362

Local de coleta de dados: \_\_\_\_\_

Nome da paciente: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_ anos

Responsável legal: \_\_\_\_\_

Objetivo do estudo/Riscos/Procedimentos/Benefícios/Sigilo:

O senhor está sendo convidado a participar de uma pesquisa, onde será colhido 15ml de sangue por punção venosa, a coleta será realizada no consultório de infectologia do HUSM, no momento da consulta. As amostras de sangue serão processadas e analisadas no laboratório do Departamento de Microbiologia e Parasitologia pelo próprio pesquisador. O senhor, também, está sendo convidado a responder um questionário, de forma voluntária, tendo o direito de desistir a qualquer momento. Não haverá represália pela não participação no estudo. Isto é, o atendimento clínico ambulatorial está garantido independente da sua participação no projeto. **É fornecida uma cópia do TCLE ao participante da pesquisa.**

**Objetivo:** a pesquisa avaliará a atividade de algumas substâncias que compõem o sangue de pacientes com HIV, para melhor entendermos sobre o HIV e gerarmos informações capazes de futuramente auxiliar no controle e novos tratamentos.

**Procedimento e riscos:** Na coleta de sangue haverá o risco de um pequeno desconforto devido à picada da agulha, e do local da coleta ficar dolorido ou arroxeadado, voltando ao normal em poucos dias, não causando problemas a sua saúde. Ao responder ao questionário pode haver cansaço.

**Benefícios:** os resultados não irão trazer benefícios diretos, porém sua contribuição é importante. Com esse estudo, poderemos aprimorar nossos conhecimentos sobre a evolução e tratamento da doença. Ao participar desta pesquisa o senhor não terá gasto ou lucro financeiro. Não será feito pagamento pela sua participação na pesquisa.

**Confidencialidade:** as informações fornecidas no questionário serão de conhecimento apenas dos pesquisadores responsáveis. Em nenhum momento será revelado ou utilizado seu nome. Os dados serão arquivados por um período de 5 anos, e depois destruídos.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito deste estudo. Ficaram claros para mim quais são os objetivos deste estudo, os procedimentos a

serem realizados, seus desconfortos e riscos, assim como a garantia de que minhas informações serão preservadas. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo.

Santa Maria, ..... de .....de .....

---

Assinatura do sujeito de pesquisa/representante legal /marca datiloscópica  
N. identidade (para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste sujeito de pesquisa ou representante legal para a participação neste estudo.

Santa Maria, ..... de ..... de .....

---

Assinatura do responsável pelo estudo

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com os pesquisadores:

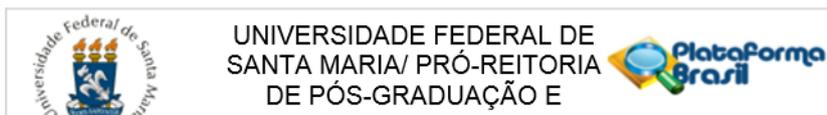
Daniela Bitencourt Rosa Leal: 55-3220-9581 –

João Felipe Peres Rezer: 55-8435-6438

Comitê de Ética em Pesquisa: Av. Roraima,1000-Prédio da Reitoria-2º andar-sala comitê de ética-Campus Universitário-Bairro Camobi -97105-900- Santa Maria- RS- Telefone: 0-xx-55-3220-9362

## **ANEXO 1**

### **APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA**



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** MARCADORES INFLAMATÓRIOS, CARDÍACOS E EXPRESSÃO DE ECTOENZIMAS DO SISTEMA PURINÉRGICO EM PLAQUETAS DE PACIENTES HIV POSITIVOS

**Pesquisador:** Daniela Bitencourt Rosa Leal

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 45452415.1.0000.5346

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Santa Maria/ Pró-Reitoria de Pós-Graduação e

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 1.122.509

**Data da Relatoria:** 14/07/2015

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Apresenta termo de confidencialidade, TCLE, folha de rosto, autorização institucional, registro do projeto, devidamente redigidos e assinados.

**Recomendações:**

Veja no site do CEP - <http://w3.ufsm.br/nucleodecomites/index.php/cep> - na aba "orientações gerais", modelos e orientações para apresentação dos documentos. Acompanhe as orientações disponíveis, evite pendências e agilize a tramitação do seu projeto.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Sem pendências ou recomendações.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Endereço:** Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar  
**Bairro:** Camobi **CEP:** 97.105-970  
**UF:** RS **Município:** SANTA MARIA  
**Telefone:** (55)3220-9362 **E-mail:** cep.ufsm@gmail.com