

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

**AVALIAÇÃO DOS METABÓLITOS DO ÓXIDO  
NÍTRICO NA INFECÇÃO PELO HIV E IMPACTO DA  
TERAPIA ANTIRRETROVIRAL SOBRE AS  
CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE NITRITO/NITRATO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Renata Mezomo Soccá**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2014**

**AVALIAÇÃO DOS METABÓLITOS DO ÓXIDO NÍTRICO NA  
INFECÇÃO PELO HIV E IMPACTO DA TERAPIA  
ANTIRRETROVIRAL SOBRE AS CONCENTRAÇÕES  
SÉRICAS DE NITRITO/NITRATO**

**Renata Mezomo Socal**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**

**Orientador: Prof. Dr. José Edson Paz da Silva**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2014**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO DOS METABÓLITOS DO ÓXIDO NÍTRICO NA  
INFECÇÃO PELO HIV E IMPACTO DA TERAPIA  
ANTIRRETROVIRAL SOBRE AS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE  
NITRITO/NITRATO**

elaborada por  
**Renata Mezomo Soccá**

como requisito parcial para a obtenção do grau de  
**Mestre em Ciências Farmacêuticas**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**José Edson Paz da Silva, Dr. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)

---

**Maria do Carmo dos Santos Araújo, Dr<sup>a</sup>. (UNIFRA)**

---

**Sandra Trevisan Beck, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)**

Santa Maria, 09 de julho de 2014.

Dedico este trabalho aos meus avós, Túlio e Brunilda Mezomo e Adelino e Élia Barbieri (*in memoriam*), os quais começaram a nossa história.

## AGRADECIMENTOS

À Santíssima Trindade, pela vida, proteção e luz no meu caminho e à Nossa Senhora, pelo amparo de Mãe.

Aos meus pais, Mauri e Sônia, pelo amor, pela bondade, pela paciência, pelas ajudas e por terem me ensinado a ser “gente”. Deus não poderia ter me dado pais melhores.

Às minhas irmãs, Marlova e Juliana, e ao meu irmão, Maurício, pelo companheirismo de todas as horas, pelo exemplo de pessoas comprometidas com o bem e por sempre me acharem melhor do que realmente sou. À Lola, um obrigada especial pelo apoio logístico que sempre me deu, e à Juca pela sabedoria de uma socióloga “das boas”.

Ao Rodrigo, porque, juntos há 24 anos, apesar dos tropeços, continuamos de mãos dadas. O nosso amor é definitivo.

Aos nossos filhos, Bruno e Marina, que me mostraram a mais verdadeira forma de amar. Bruno, que fez com que eu não tivesse outra opção a não ser me tornar adulta, o meu amor por ti transcende qualquer distância e é incondicional. Marina, flor da nossa casa, sol do nosso dia, tu enches nossa vida de sorrisos e boas gargalhadas. Que alegria tu teres nascido e que filha carinhosa e menina inteligente e bondosa tu és. O nosso amor é infinito.

A todos os meus familiares, os da terra e os que já estão no céu, pelo afeto que sempre recebi.

À Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), pelo acolhimento desde os meus 17 anos, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), pela oportunidade e ao Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), no qual o meu trabalho me dá o sustento há quase 20 anos.

Aos voluntários, pacientes ou não, que participaram da minha pesquisa e à Cibele, Laísa, Maiara, Sabrina e Juliana de Oliveira pela ajuda.

Ao Diretor do Laboratório de Análises Clínicas (LAC), Elehú Oliveira, e à Iara Bertoncello, Vice-diretora e amiga, pelo apoio e incentivo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Edson Paz da Silva, pela confiança em mim depositada.

Ao Prof. Dr. Rafael Noal Moresco, pelos ensinamentos, pela inestimável ajuda, pelo apoio, pela confiança e pela amizade. Todos os obrigadas serão insuficientes.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra Beck, pelo “pontapé inicial”, pelo incentivo, pelas boas vibrações, pelo alto astral e pela disponibilidade para avaliar o meu trabalho. Muito obrigada.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria do Carmo Araújo, pela amizade e disponibilidade em participar desta avaliação.

À Dr.<sup>a</sup> Rosane Souza dos Santos, pelas “dicas” e disponibilidade em avaliar este trabalho.

À Prof.<sup>a</sup> M<sup>a</sup> Juliana Fleck, pela revisão, pelo incentivo e pelas palavras carinhosas que aumentaram minha autoestima.

Ao amigo José Antônio Mainardi de Carvalho, pela incansável disposição em me ajudar. Muiiiiiiiiiiiiiito obrigada, Zé, tu és uma pessoa especial pra mim.

Ao doutorando Guilherme Vargas Bochi, por ter dispensado tempo, neurônios e paciência comigo. Serei eternamente grata.

A todas as alunas do Labclim, por serem sempre tão agradáveis e tão disponíveis em me ajudar, incentivar e ensinar. Vocês merecem muito sucesso.

À amiga Ângela, um ESPECIAL obrigada, pela parceria e amizade de todos os dias, pelo apoio, pela confiança, pelo carinho e por trabalhar enquanto eu estudava.

À amiga Lú, nunca agradecerei o bastante por tantas vezes ter sido “ponte” na minha vida, pela amizade de todas as horas e por ter os ouvidos sempre prontos. OBRIGADA.

Às queridas Carminha, Edinha, Elaine, Karla, Mariane e Michelle, por agregarem alegria aos meus dias e serem sempre tão amigas e carinhosas.

À amiga Nélia, pela parceria, pela amizade e pelo incentivo.

À amiga Norma, pelo seu enorme coração e tanto carinho.

Ao amigo Clóvis, a vanguarda dos mestres, pela amizade e estímulo.

A todas amigas e colegas do LAC e da Hemato-Oncologia, pelas contribuições e pela amizade, em especial à Sandra Huber, que me emprestou os primeiros artigos.

Às minhas amigas do grupo de oração da Igreja do Bonfim, por me ensinarem a perseverar na fé.

À Cleci, por me ajudar a manter a “casa em ordem” e cuidar da Marina como ninguém, para que eu pudesse estudar.

A todas as pessoas que, em algum momento desta jornada, ouviram-me, acalmaram-me e incentivaram-me, o meu muito obrigada.

Neste mestrado, todas as portas nas quais eu bati foram abertas com um sorriso e um SIM. Por isso, serei eternamente grata e estarei pronta para retribuir sempre que precisarem. OBRIGADAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!

“Pedi e recebereis; buscai e achareis; batei e abrir-se-vos-á. Pois todo aquele que pede, recebe; quem procura, acha; e a quem bate, a porta será aberta”.

Jesus (Mateus 7,7)

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
Universidade Federal de Santa Maria

### **AVALIAÇÃO DOS METABÓLITOS DO ÓXIDO NÍTRICO NA INFECÇÃO PELO HIV E IMPACTO DA TERAPIA ANTIRRETROVIRAL SOBRE AS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE NITRITO/NITRATO**

AUTORA: RENATA MEZOMO SOCCAL

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ EDSON PAZ DA SILVA

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 09 de julho de 2014.

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) é uma doença de origem infecciosa, causada pelo vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). O vírus infecta principalmente linfócitos T auxiliares  $CD_4^+$ , gerando uma severa imunodepressão e maior susceptibilidade a infecções. A terapia antirretroviral de alta eficácia (HAART) reduz significativamente a carga viral e restabelece o sistema imune. A infecção requer acompanhamento do paciente ao longo de toda a vida, e a falha na adesão e os efeitos adversos provocados pela medicação são fatores limitantes do tratamento. As razões para estes efeitos parecem ser multifatoriais e entre elas temos os distúrbios metabólicos, a toxicidade dos antirretrovirais (ARV) e o impacto da replicação viral, resultando em aumento de doenças não relacionadas à AIDS, aterosclerose subclínica e disfunção endotelial. Sabe-se que o endotélio desempenha um papel fundamental na saúde vascular. Pacientes HIV positivos possuem a função endotelial prejudicada, e uma das importantes causas de morbidade e mortalidade prematuras são as complicações cardiovasculares. Nesse contexto, já foi demonstrado que o prejuízo das células endoteliais, *in vivo* e *in vitro*, pode envolver a formação de espécies reativas de nitrogênio (ERNs) e alterar a biodisponibilidade do óxido nítrico (NO). Muitos mecanismos regulatórios do sistema cardiovascular têm o envolvimento do NO, incluindo o tônus vascular, a estrutura vascular e as interações célula-célula nos vasos sanguíneos. Estudos têm sido realizados a fim de elucidar o papel do NO nas doenças vasculares. Porém, existem poucos relatos sobre os níveis deste marcador em pacientes HIV positivos. Assim, o principal objetivo deste trabalho foi avaliar os níveis de nitrito/nitrato (NOx), metabólitos do NO, em pacientes HIV positivos e verificar sua possível alteração com o uso da HAART. Para isso, foram dosados os níveis séricos de NOx em 101 pacientes HIV positivos, dos quais 18 não faziam uso da medicação, e em 46 pacientes HIV negativos. Os pacientes HIV positivos apresentaram níveis de NOx [62.4 (28.4-116.0)  $\mu\text{mol/L}$ ] inferiores



aos do grupo controle [86.8 (56.1-137.5)  $\mu\text{mol/L}$ ]. Quando comparados conforme o uso ou não do tratamento, pacientes em HAART tiveram concentrações dos metabólitos ainda menores [60.8(27.9-105.4)  $\mu\text{mol/L}$ ] em relação aos não tratados [127.0(36.2-277.1)  $\mu\text{mol/L}$ ]. Os achados sugerem que estas diminuições podem ser um importante mecanismo que predispõe os pacientes a terem um desfecho cardiovascular. Sendo assim, a manutenção destes níveis dentro dos limites normais pode ser uma estratégia terapêutica para reduzir as doenças cardiovasculares.

**Palavras-chave:** Vírus da Imunodeficiência Humana. Síndrome da Imunodeficiência Adquirida. Terapia antiretroviral de alta eficácia. Óxido nítrico. Doença Cardiovascular.

## **ABSTRACT**

Master Dissertation  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
Universidade Federal de Santa Maria

### **EVALUATION OF NITRIC OXIDE METABOLITES IN HIV INFECTION AND THE IMPACT OF ANTIRETROVIRAL THERAPY ON SERUM LEVELS OF NITRITE/NITRATE**

AUTHOR: RENATA MEZOMO SOCCAL  
ADVISOR: PROF. DR. JOSÉ EDSON PAZ DA SILVA  
Place and Date: Santa Maria, July 09, 2014.

The Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) is a disease of infectious origin, caused by the human immunodeficiency virus (HIV). The virus infects primarily helper T CD<sub>4</sub><sup>+</sup> lymphocytes, generating a severe immunosuppression and increased susceptibility to infections. Highly active antiretroviral therapy (HAART) significantly reduces viral load and restores the immune system. The infection requires monitoring throughout life and compliance failures and adverse effects of the medication are factors limiting treatment. The reasons for these effects appear to be multifactorial and between them are metabolic disorders, toxicity of antiretroviral drugs and the impact of viral replication, resulting in an increase of non-AIDS-related diseases, subclinical atherosclerosis and endothelial dysfunction. It is known that the endothelium plays a central role in maintaining vascular health. HIV-positive patients have impaired endothelial function and one of the major causes of morbidity and premature mortality are cardiovascular complications. In this context it was demonstrated that the loss of endothelial cells *in vivo* and *in vitro*, may involve the formation of reactive nitrogen species (RNS) and alter the bioavailability of nitric oxide (NO). Many regulatory mechanisms of the cardiovascular system have the involvement of NO, including vascular tone, vascular structure and cell-cell interactions in blood vessels. Studies have been conducted to elucidate the role of NO in vascular diseases. But there are few reports on the levels of this marker in HIV positive patients. Thus, the main objective of this study was to investigate the levels of nitrite/nitrate (NO<sub>x</sub>) in HIV-infected patients and verified whether the levels of this marker would alter with HAART. One hundred forty-seven volunteers were included in this case-control study. The subjects were divided into two groups: HIV-infected patients (n=101) and healthy subjects (n=46). Then, the HIV-infected patients were divided into two groups: HIV-infected patients on highly active antiretroviral therapy (HAART) (n=83) and HIV-infected patients without HAART (n=18). It was demonstrated that HIV-

infected patients had significantly lower NO<sub>x</sub> levels [62.4 (28.4-116.0) μmol/L] than healthy individuals [86.8 (56.1-137.5) μmol/L]. Additionally, it was also found significantly lower NO<sub>x</sub> levels among treated [60.8 (27.9-105.4) μmol/L] compared to untreated patients [127.0 (36.2-277.1) μmol/L]. The findings suggest that these changes may be an important mechanism that predisposes patients to have a cardiovascular outcome and thus, the maintenance of these levels within the normal range may be a therapeutic strategy to reduce cardiovascular disease.

**Keywords:** Human immunodeficiency virus. Acquired Immunodeficiency Syndrome. Highly active antiretroviral therapy. Nitric oxide. Cardiovascular disease.

## LISTA DE TABELAS-ARTIGO

<b>Table 1.</b> Baseline characteristics of the study population. ....	49
<b>Table 2.</b> Multiple regression analysis of NOx as a dependent variable adjusting for gender, lipids, hematological parameters and liver enzymes. ....	50
<b>Table 3.</b> Baseline characteristics of HIV- untreated and HIV-treated patients. ....	51

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura do HIV-1.....	23
Figura 2 – Ciclo replicativo do HIV. ....	25
Figura 3 – Locais de ação dos antirretrovirais.....	29
Figura 4 – Síntese do NO catalizada pela NOS.....	33
Figura 5 – Papel do NO no relaxamento vascular. ....	35

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADMA	dimetilarginina assimétrica
AIDS	síndrome da imunodeficiência adquirida
ALT	alanina aminotransferase
ARV	antirretrovirais
AST	aspartato aminotransferase
AZT	zidovudina
BH <sub>4</sub>	tetrahidrobiopterina
cDNA	ácido desoxirribonucléico complementar
cNOS	óxido nítrico sintase constitutiva
CRFs	formas recombinantes circulantes
DNA	ácido desoxirribonucléico
EDRF	fator de relaxamento derivado do endotélio
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EO	estresse oxidativo
ERNs	espécies reativas de nitrogênio
EROs	espécies reativas de oxigênio
GMPc	guanosina monofosfato cíclica
FDA	Food and Drug Administration
GP	glicoproteína
HAART	terapia antiretroviral de alta eficácia ( <i>highly active antiretroviral therapy</i> )
HIV	vírus da imunodeficiência humana
HIV-1	vírus da imunodeficiência tipo 1
HIV-2	vírus da imunodeficiência tipo 2
HO•	hidroxila
HB	hemoglobina
HNO <sub>2</sub>	ácido nitroso
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrogênio
HNO <sub>2</sub>	ácido nitroso
HT	hematócrito
IN	Integrase
IIN	inibidores da integrase
IP	inibidores da protease
ITRN	inibidores da transcriptase reversa nucleosídeos
ITRNN	inibidores da transcriptase reversa não- nucleosídeos
iNOS	óxido nítrico sintase induzida ou inflamatória
KD	kilodaltons
mRNA	RNA mensageiro
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato
nNOS	óxido nítrico sintase neuronal
N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	óxido nitroso
NO	óxido nítrico
NO <sub>2</sub>	nitrito
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	nitrato
NOS	óxido nítrico sintase
NOx	nitrato/nitrito
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	ânion superóxido

OH•	radical hidroxila
OONO-	peroxinitrito
ONU	Organização das Nações Unidas
P	proteína
PLA	plaqueta
PR	protease
PRE	pré-exposição
RBC	contagem total de eritrócitos
RDW	amplitude de distribuição dos eritrócitos
RL	radicais livres
RNA	ácido ribonuclêico
RO•:	radical alcoxila
ROO•	radical peroxila
RS	Rio Grande do Sul
SIV	vírus da imunodeficiência dos símios
SRA	síndrome retroviral aguda
TR	transcriptase reversa
VPM	volume Plaquetário
WBC	contagem total de leucócitos

## **LISTA DE ANEXOS**

<b>Anexo A - Carta de aprovação do protocolo de pesquisa. ....</b>	<b>66</b>
<b>Anexo B - Comprovante de submissão do artigo científico. ....</b>	<b>68</b>



## SUMÁRIO

<b>APRESENTAÇÃO</b> .....	17
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	18
Objetivo geral.....	19
Objetivos específicos .....	19
<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	21
Vírus da Imunodeficiência Humana e Síndrome da Imunodeficiência Adquirida .....	21
Terapia antiretroviral de alta eficácia (HAART) .....	27
Óxido nítrico .....	32
<b>ARTIGO - EVALUATION OF NITRIC OXIDE IN HIV INFECTION AND THE INFLUENCE OF ANTIRETROVIRAL THERAPY ON SERUM LEVELS OS NITROC OXIDE METABOLITES</b> .....	38
<b>CONCLUSÕES</b> .....	52
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	53
<b>ANEXOS</b> .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

## APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo, o qual se encontra no item **ARTIGO – EVALUATION OF NITRIC OXIDE IN HIV INFECTION AND THE INFLUENCE OF ANTIRETROVIRAL THERAPY ON SERUM LEVELS OS NITROC OXIDE METABOLITES**. As seções “Materiais e Métodos” e “Resultados e Discussão” encontram-se no próprio artigo e representam a íntegra deste estudo. O item **CONCLUSÕES**, encontrado no final desta dissertação, apresenta interpretações e comentários gerais sobre os resultados contidos neste trabalho. As **REFERÊNCIAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO, REVISÃO DE LITERATURA** e **CONCLUSÕES** desta dissertação, uma vez que as referências utilizadas para a elaboração do artigo estão mencionadas no próprio artigo.

## INTRODUÇÃO

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) é uma doença de origem infecciosa, causada pelo vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (COTRAN et al., 1996). É transmissível por meio de sangue, secreções humanas contaminadas e verticalmente de mãe para filho durante a gravidez e o parto e é uma consequência da ação deste vírus no organismo (HLADIK; MCEL RATH, 2008). O HIV atua no hospedeiro infectando as células do sistema imune, particularmente as que expressam a molécula CD<sub>4</sub>, principalmente linfócitos T auxiliares CD<sub>4</sub><sup>+</sup>, mas também macrófagos e células dendríticas (RAFFANTI; HAAS, 2006). O efeito citopático exercido pelo vírus leva à diminuição dos linfócitos T CD<sub>4</sub><sup>+</sup> e, uma vez que estes são o centro da resposta imune, sua depleção ao longo do tempo acaba gerando severa imunodepressão e, conseqüentemente, maior suscetibilidade a infecções (FAUCI et al., 1991; DE CLERCQ, 2004; ABBAS; LICHTMAN, 2006). Aproximadamente 34 milhões de pessoas em todo o mundo estão infectadas pelo HIV. No Brasil, é estimado que cerca de 718 mil pessoas portem o vírus (JOINT UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS, 2013a; BRASIL, 2013a).

Com a descoberta dos antirretrovirais (ARV), a infecção passou a ser reconhecida como uma doença crônica que requer tratamento ao longo de toda a vida (PERE et al., 2008). A terapia antirretroviral de alta eficácia, conhecida pela sigla HAART, do inglês *highly active antiretroviral therapy*, reduziu significativamente a carga viral, restabeleceu o sistema imune e aumentou a expectativa de vida dos pacientes (HUNG; CHANG, 2004). Apesar de todo o otimismo em relação a AIDS com o advento dos ARV, constata-se que alguns pacientes não usufruem de todos os benefícios oferecidos pelo uso dos medicamentos. Isso ocorre, em parte, devido à falha na adesão ao tratamento, a qual é fundamental para o sucesso da terapia (RABOUD et al., 2002). A dificuldade de adesão acontece, principalmente, pela complexidade da terapia antirretroviral, que exige organização e compromisso por parte do paciente, mas há também outro obstáculo importante: os efeitos colaterais ocasionados pela medicação (BAER; ROBERTS, 2002). A HAART está associada à aterosclerose, acidose láctica, hiperlipidemia, intolerância a glicose e lipodistrofia, e, mesmo com uma terapia eficaz, os pacientes HIV positivos têm maior risco de morbidade e mortalidade (GIL et al., 2005; HSUE; DEEKS; HUNT, 2012; WADA et al., 2013). As complicações desta patologia incluem câncer, doenças hepáticas, declínio neurocognitivo e desordens ósseas e vasculares (DEEKS; PHILLIPS, 2009). As razões não estão bem esclarecidas, mas parecem ser multifatoriais. Entre elas, estão os distúrbios metabólicos, a toxicidade dos ARV e o impacto

da replicação viral, que resultam em aumento de doenças não relacionadas à AIDS, aterosclerose subclínica e disfunção endotelial (BARBARO, 2003; FRIIS-MOLLER et al., 2007; GRINSPOON et al., 2008; MASIA et al., 2013).

Sabe-se que o endotélio desempenha papel fundamental na manutenção da saúde vascular (FURCHGOTT; VANHOUTTE, 1989). Pacientes HIV positivos possuem função endotelial prejudicada, e uma das importantes causas de morbidade e mortalidade prematuras são as complicações cardiovasculares (HO et al., 2012). Nesse contexto, já foi demonstrado que o prejuízo das células endoteliais, *in vivo* e *in vitro*, pode envolver a formação de espécies reativas de nitrogênio (ERNs) e alterar a biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) (WATTANAPITAYAKUL; BAUER, 2001).

O NO é um radical livre reativo, uma das mais simples moléculas conhecidas. Sua formação é catalisada pelo óxido nítrico sintase (NOS), via oxidação da L-arginina (MONCADA; HIGGS, 1993). Uma variedade de mecanismos regulatórios do sistema cardiovascular tem o envolvimento do NO, incluindo o tônus vascular, a estrutura vascular e as interações célula-célula nos vasos sanguíneos. Tendo em vista a combinação destes efeitos, o NO endotelial provavelmente representa a mais importante defesa antiaterogênica na vasculatura (FORSTERMANN; MUNZEL, 2006).

Estudos têm sido realizados a fim de elucidar o papel do NO nas doenças vasculares (STONER et al., 2012; HAFNER et al., 2014). Entretanto, existem poucos relatos sobre os níveis deste marcador em pacientes HIV positivos. Além disso, segundo pesquisas realizadas pela autora, o impacto da HAART sobre os metabólitos do NO ainda não foi reportado. Dessa forma, é de extrema relevância avaliar estes níveis em pacientes HIV positivos, bem como verificar a sua possível modificação devido à terapia antirretroviral.

### **Objetivo geral**

Avaliar os níveis séricos de nitrito/nitrato (NOx) em pacientes HIV positivos e comparar os níveis deste marcador entre pacientes submetidos ou não à HAART.

### **Objetivos específicos**

- Comparar os níveis de NOx em pacientes HIV positivos e indivíduos controle HIV negativo;

- investigar os níveis de NOx em pacientes HIV positivos submetidos e não submetidos à HAART;
- avaliar os níveis de glicose, T-colesterol, HDL-colesterol, LDL-colesterol, triglicerídeos, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) e compará-los entre os grupos do estudo;
- verificar a variação dos parâmetros hematológicos: contagem total de eritrócitos (RBC), contagem total de leucócitos (WBC), hematócrito (HT), hemoglobina (HB), amplitude de distribuição dos eritrócitos (RDW), plaquetas (PLA) e volume plaquetário médio (VPM) e compará-los entre os grupos do estudo;
- investigar os níveis de carga viral, linfócitos TCD<sub>4</sub><sup>+</sup>, CD<sub>8</sub><sup>+</sup> e Relação CD<sub>4</sub>/CD<sub>8</sub> e compará-los entre os pacientes submetidos e não submetidos à HAART.

## **REVISÃO DE LITERATURA**

### **Vírus da Imunodeficiência Humana e Síndrome da Imunodeficiência Adquirida**

O HIV é o agente etiológico causador da AIDS, uma das pandemias mais mortais da história da humanidade (BISWAS, 2012). O vírus causador da doença foi isolado no ano de 1983, pela equipe de Luc Montagnier e, um pouco mais tarde, por Robert Gallo e Jay Levy (COFFIN et al., 1986). Em 1986, um segundo vírus com algumas diferenças nas suas características antigênicas e relações filogenéticas foi descoberto (CLAVEL et al., 1986). Assim, o HIV passou a ser classificado em HIV-1 e HIV-2 (CLAVEL et al., 1987). Ao passo que o HIV-1 é responsável pela pandemia global, o HIV-2 é mais restrito a alguns países da África Ocidental, sendo também responsável por casos da doença em indivíduos africanos que vivem em outros continentes (MARLINK et al. 1994; ARIEN et al. 2005; SANTOS; COELHO-MARTINS; AZEVEDO, 2007 ). Os dois tipos de vírus associados à AIDS foram introduzidos na espécie humana por eventos de transmissão de caráter zoonótico. O Vírus da Imunodeficiência dos Símios (SIV) foi transmitido ao homem por exposição direta ao sangue de primatas africanos naturalmente infectados, o que acabou gerando várias linhagens do HIV (HAHN et al., 2000).

O HIV-1 é uma partícula esférica que mede de 100 a 120 nm de diâmetro e pertence à Família Retroviridae e ao Gênero dos Lentivírus (KLINGER; SHAI, 1997). Caracteriza-se por possuir a enzima transcriptase reversa (TR), que copia o ácido ribonuclêico (RNA) viral na forma de um ácido desoxiribonuclêico (DNA) complementar (cDNA), o qual é integrado, então, ao genoma da célula hospedeira (NOTTET; GENDELMAN, 1996; DYER, 1998). O fato de a TR não possuir mecanismo corretor durante a retrotranscrição do genoma viral resulta em uma maior taxa de erro na incorporação de nucleotídeos, do que decorre a grande variabilidade genética do vírus (OVERBAUGH; BANGHAM, 2001). Além disso, outras causas contribuem para a diversidade apresentada pelo HIV-1. Entre elas, estão a rápida replicação viral, a alta taxa de recombinação intermolecular durante a síntese do cDNA e a pressão seletiva elevada exercida pelo sistema imune do hospedeiro e pela terapêutica antirretroviral (PEETERS; AGHOKENG; DELAPORTE, 2010). Essa variabilidade genética causa impacto em aspectos que vão desde o monitoramento das pessoas infectadas até a eficácia do tratamento e desenvolvimento de uma vacina eficaz (GAMBLE; MATTHEWS, 2010; NDUNG’U; WEISS, 2012; DANGETI, 2014).

O vírus apresenta, em seu núcleo, duas cópias de RNA de cadeia simples, encapsuladas pelo nucleocapsídeo e capsídeo, e é externamente envolvido por um envelope composto de dupla camada fosfolipídica (CARRASCO; ALMENDRAL DEL RIO, 2006). Três genes principais codificam as proteínas estruturais e as enzimas virais: *env*, *gag* e *pol* (SORIANO et al., 2005). A abreviação gp é utilizada para glicoproteína e p para proteína, seguidas de um número que indica o peso molecular em kilodaltons (KD) (FRANKEL; YOUNG, 1998). No envelope viral, são encontradas as glicoproteínas gp 160, gp 120 e gp 41, codificadas pelo gene *env*. A partir da clivagem da proteína precursora gp160, obtém-se a glicoproteína de superfície gp 120 e a glicoproteína transmembranar gp41, as quais estão diretamente envolvidas na fusão do vírus às células do hospedeiro (SIERRA; KUPFER; KAISER, 2005). A gp 120 é responsável pela ligação do vírus com o receptor celular CD<sub>4</sub> e com correceptores presentes nas células alvo, já a gp 41 encarrega-se da fusão do invólucro viral com a membrana celular (GORRY; ANCUTA, 2011). O gene *gag* codifica a p55, a partir da qual as proteínas estruturais p6, p9, p17 e p 24 são formadas. Estas são proteínas da matriz, do capsídeo e do nucleocapsídeo (BALTER, 1998). Além da TR, as enzimas integrase (IN) e protease (PR) são cruciais no ciclo replicativo viral, sendo codificadas pelo gene *pol*. A TR faz a conversão do RNA viral de cadeia simples em cDNA proviral de cadeia dupla. A IN está envolvida no mecanismo de integração do cDNA retrotranscrito ao genoma das células hospedeiras, e a PR é responsável pelo processamento de poliproteínas durante a fase de maturação, tornando, assim, infectantes as partículas virais (EMERMAN; MALIM, 1998; NISOLE; SAIB, 2004) (Figura 1). Completando o genoma, o vírus ainda possui os genes *tat* e *rev*, que codificam as proteínas reguladoras Tat e Rev, e os genes *nef*, *vif*, *vpr* e *vpu*, que codificam as proteínas acessórias Nef, Vif, Vpr e Vpu. Entre as funções das proteínas reguladoras e acessórias estão o aumento da infectividade e o estímulo da replicação viral e da liberação do vírus (SWANSON; MALIM, 2008).

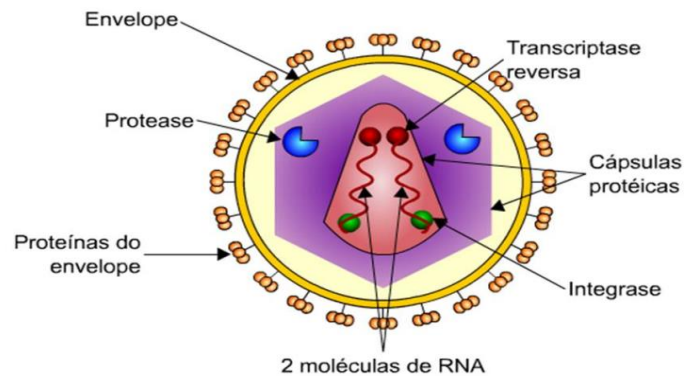


Figura 1 – Estrutura do HIV-1.

Fonte: <http://kellybiologia.blogspot.com.br/2013/03/caracteristicas-dos-seres-vivos-aula-5.html>

A análise filogenética do genoma completo de numerosas estirpes virais, com origens distintas geograficamente, permitiu a classificação do HIV-1 em grupos, subtipos, sub-subtipos e formas recombinantes circulantes (CRFs). São, no total quatro grupos, dos quais o M (*major*) tem distribuição global e é o responsável pela pandemia. Este grupo possui diversos subtipos (A-D, F-H, J,K), sub-subtipos (A1-A4, F1-F2) e CRFs (OSMANOV et al., 2002; VALLARI et al., 2011). A distribuição dos subtipos é heterogênea, variando conforme a região geográfica. Por exemplo, o subtipo B é frequentemente encontrado na Europa e nas Américas, mas apresenta pouca frequência na África e na Ásia, onde os subtipos A, C, D e E são predominantes (REQUEJO, 2006). No Brasil, estudos indicam que o subtipo B é o mais prevalente, seguido pelos subtipos F e C, com poucos casos identificados dos subtipos D e A (BRIGIDO et al., 2007; QUEIROZ et al., 2007). Entretanto, a Região Sul do país tem caracterizado-se por apresentar alta prevalência do subtipo C, principalmente no Estado do Rio Grande do Sul (RS) (SIMON et al, 2010; NUNES et al., 2014). O grupo O (*outlier*) já provocou dezenas de milhares de infecções na África Centro-Occidental, o grupo N (*new*) foi encontrado em poucas pessoas na África, e o grupo P (*prototip*) foi recentemente identificado em dois indivíduos originários do Camarões (VAN HEUVERSWYN et al., 2006).

O HIV infecta particularmente células imunológicas que expressam a molécula CD<sub>4</sub>, como macrófagos, células dendríticas e, especialmente, linfócitos T auxiliares, envolvidos diretamente na defesa do organismo contra micro-organismos invasores (RAFFANTI; HAAS, 2006). O processo de infecção das células pelo HIV-1 tem início por meio da ligação da gp 120 com o receptor de membrana CD<sub>4</sub>. As mudanças conformacionais resultantes desta ligação levam à exposição de novos locais desta glicoproteína, permitindo a sua ligação a correceptores, ou seja, a proteínas da subfamília das quimiocinas, responsáveis por facilitar a



entrada do vírus nas células do hospedeiro (DOMS, 2004; SORIANO et al., 2005). Os correceptores virais mais importantes são o CCR5 e o CXCR4 (GORRY; ANCUTA, 2011). Por sua vez, a formação do complexo gp120/CD<sub>4</sub>/correceptor induz a um rearranjo na conformação da gp41, permitindo a exposição de uma região hidrofóbica, denominada péptido de fusão. Este insere-se na membrana da célula hospedeira possibilitando a entrada do capsídeo viral (SIERRA; KUPFER; KAISER, 2005). O capsídeo viral é destruído pela ação de enzimas celulares e o material genético do vírus é liberado no citoplasma da célula hospedeira (FORSMAN; WEISS, 2008). É necessário, então, que o RNA viral seja transcrito para cDNA, a fim de que o código genético do HIV junte-se ao DNA da célula hospedeira. Essa função é exercida pela transcriptase reversa, que produz uma cadeia única de DNA a partir do RNA do vírus. A transcriptase reversa atua também como polimerase de DNA, produzindo uma segunda cadeia de DNA igual à primeira. O resultado desse processo é uma réplica em DNA de cadeia dupla do modelo do RNA original (GERARD; MAILLARD, 2000). Já no núcleo da célula infectada, a dupla cadeia de DNA viral é inserida ao acaso no DNA humano pela atividade da IN, transformando a célula hospedeira numa espécie de “fábrica” de novos vírus (NISOLE; SAIB, 2004). Uma vez integrado, o DNA viral é copiado para RNA mensageiro (mRNA), que usa todos os mecanismos da célula hospedeira para produzir as proteínas centrais do vírus, proteínas de envelope, enzimas e proteínas reguladoras essenciais para a replicação do HIV (DOMS, 2004). Novos vírus são, então, formados na superfície da célula humana. Gradualmente, eles brotam destas células e são liberados na corrente sanguínea, ainda na forma imatura, portanto não infectantes. A PR atua nesta fase, clivando as poliproteínas do HIV. As proteínas individuais são remontadas para formar um vírus estruturado e maduro, incluindo cada uma das enzimas e proteínas necessárias para a repetição do processo reprodutivo. Desse modo, este vírus pode infectar outras células (CUNNINGHAM, 1996; FREED, 2002) (Figura 2).

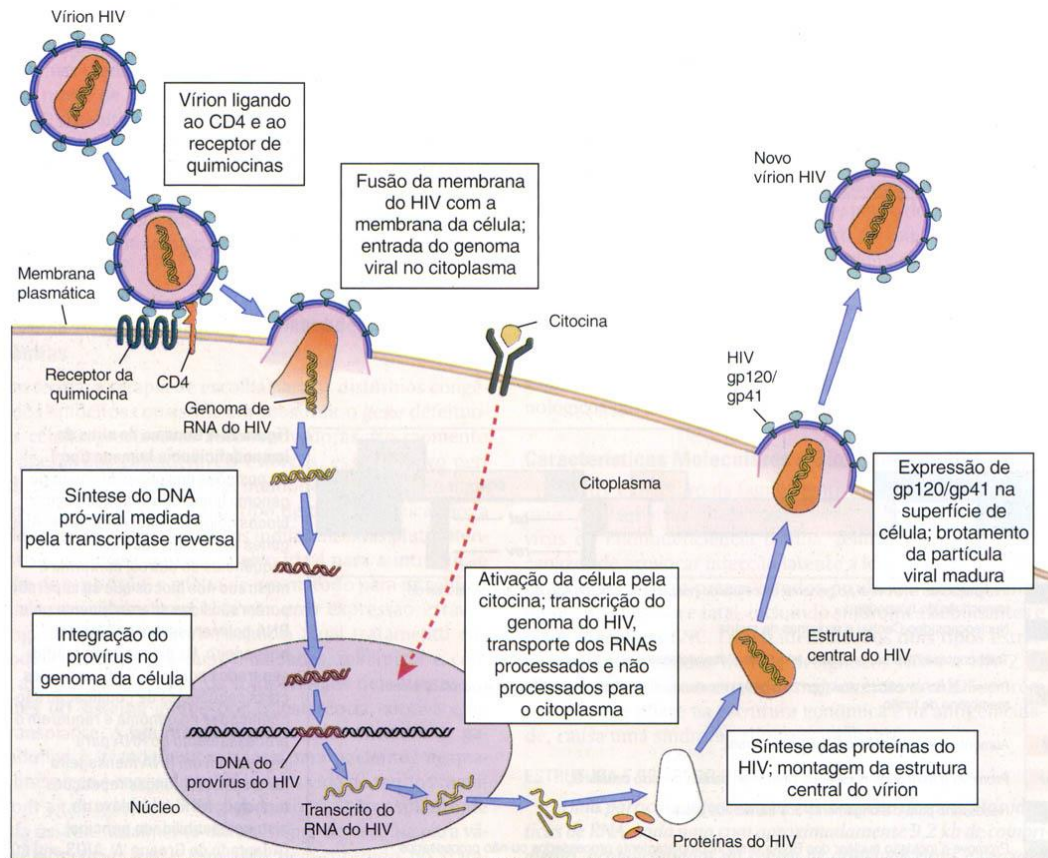


Figura 2 – Ciclo replicativo do HIV.

Fonte: [http://img1.wikia.nocookie.net/\\_\\_cb20131004045826/aia1317/pt-br/images/3/3b/Ciclo.jpg](http://img1.wikia.nocookie.net/__cb20131004045826/aia1317/pt-br/images/3/3b/Ciclo.jpg)

A AIDS foi reconhecida como uma nova doença em 1981, quando um grande número de homens, os quais eram jovens e homossexuais, morreu em decorrência de infecções oportunistas incomuns e de neoplasias raras (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 1981; GREENE, 2007). A transmissão da doença ocorre através de sangue e secreções humanas contaminadas e verticalmente de mãe para filho durante a gravidez e o parto, mas, atualmente 80% dos adultos contraem o vírus por via sexual (COHEN et al., 2011). Com o passar dos anos, houve uma heterossexualização da doença, com as mulheres representando metade das pessoas portadoras do vírus em todo o mundo (JOINT UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS, 2013).

A infecção apresenta um curso de amplo espectro, desde a fase aguda até a fase mais avançada da doença. O tempo médio estimado entre a infecção e o aparecimento da AIDS em indivíduos não tratados é em torno de 10 anos (DAAR et al., 2001). Sintomas como febre, adenopatias, faringite, fadiga, mialgia, diarreia e perda de peso podem aparecer em mais de 50% dos indivíduos de uma a três semanas após a exposição ao vírus e esta fase é

caracterizada pela alta replicação do HIV, elevada viremia e inversão na razão de linfócitos T CD<sub>4</sub><sup>+</sup>/CD<sub>8</sub><sup>+</sup> (COHEN et al., 2010). Essas manifestações clínicas, conhecidas como Síndrome Retroviral Aguda (SRA) são semelhantes às ocasionadas por outras infecções virais, assim, a infecção pelo HIV normalmente não é diagnosticada neste período (PEDERSEN et al., 1989). Quatro a seis semanas após o contágio, acontece a soroconversão e, em consequência, uma queda na viremia e o desaparecimento dos sintomas; a infecção entra na fase de latência. Essa fase pode durar de meses até anos e dependerá de fatores como grau de virulência, resposta imunológica, outras infecções e do uso de ARV, sendo ainda objeto de estudo o que realmente caracteriza o seu fim (FERREIRA; SOUZA, 2002). O HIV provoca a progressiva destruição do sistema imune do paciente, impedindo que o sistema cumpra seu papel. Assim, uma vez passado o período de latência, o aparecimento de infecções oportunistas e neoplasias é definidor para a AIDS (ABBAS; LICHTMAN, 2006). Neurotoxoplasmose, tuberculose pulmonar, meningite criptocócica, pneumonias, diarreia crônica, febre persistente, anemia, neutropenia e trombocitopenia podem ocorrer, dependendo do grau da imunodeficiência. Entre as neoplasias, as mais comuns são sarcoma de Kaposi, carcinoma cervical invasivo e linfoma não Hodgkin (RACHID; SCHECHTER, 2008). O vírus pode também causar dano direto em alguns órgãos, levando a miocardiopatias, nefropatias e neuropatias (DEEKS, 2011). O número de linfócitos TCD<sub>4</sub><sup>+</sup>, nesta fase, estará diminuído, com contagens muitas vezes inferiores a 200 células/mm<sup>3</sup> e os níveis de viremia estarão aumentados (JAMESON, 1998; ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000).

Aproximadamente 34 milhões de pessoas estão infectadas pelo HIV em todo o mundo (JOINT UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS, 2013). No Brasil, de 1980 até junho de 2013, 709.477 casos de AIDS foram registrados e o Ministério da Saúde estima que, atualmente, 718 mil pessoas são portadoras de HIV/AIDS no país. O *ranking* das taxas de detecção, segundo as Unidades da Federação, mostra que desde 2006 o Rio Grande do Sul apresenta as maiores taxas do país (41,4 casos/100.000 habitantes). Também é neste estado que se encontra a maior taxa de detecção de AIDS em menores de 5 anos. Entre as capitais brasileiras, Porto Alegre lidera a classificação por taxa de detecção de casos de AIDS, com 93,7 casos para cada 100.000 habitantes, bem à frente de Florianópolis, que ocupa o segundo lugar, com 57,0 casos por 100.000 habitantes (BRASIL, 2013a). Estes índices fizeram com que a Organização das Nações Unidas (ONU) criasse um Plano de Apoio Integrado com a Secretaria Municipal de Saúde de Porto Alegre, com políticas que visam reverter estes dados (JOINT UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS, 2013). Nunes et al. (2014) já demonstrou que o curso da doença nesta região independe do subtipo prevalente. Quanto ao

perfil etário, nos últimos anos, as maiores taxas de detecção foram encontradas em indivíduos com idades entre 30 e 49 anos. Além disso, tem sido observada uma tendência de aumento nas taxas de detecção entre jovens de 15 a 24 anos e entre adultos com mais de 50 anos (BRASIL, 2013a).

Uma detalhada compreensão do comportamento do HIV no hospedeiro é imprescindível para o adequado entendimento do diagnóstico. Em muitos países, a descoberta tardia da doença continua sendo comum, o que contribui para o aumento da mortalidade (WATERS; SABIN, 2011). No Brasil, é estimado que 95,5% das mortes ocorridas no primeiro ano após o diagnóstico foram atribuídas ao diagnóstico tardio (GRANGEIRO et al., 2011). Devido a isso, o Ministério da Saúde, baseado no sistema de estagiamento laboratorial de Fiebig e colaboradores, elaborou cinco fluxogramas que possibilitam o diagnóstico seguro da infecção em diferentes situações e localidades. Esses fluxogramas contemplam testes rápidos, imunoensaio de 3ª e 4ª geração, *Western blot* e testes moleculares, que pesquisam anticorpos, antígenos e o próprio material genético do vírus (FIEBIG et al., 2003; BRASIL, 2013b). Uma vez diagnosticado, o paciente infectado pelo HIV requer acompanhamento por profissionais da saúde ao longo de toda a vida, bem como rigorosa avaliação clínica e exames que verificam a presença de coinfeções e permitem visualizar o paciente como um todo (PERE et al., 2008). Além disso, dois testes são fundamentais para o acompanhamento da infecção e devem ser solicitados pelo menos semestralmente: a contagem de linfócitos T CD<sub>4</sub><sup>+</sup>, para monitorar o estado imunológico do paciente, e a quantificação da carga viral, para determinar o prognóstico da doença, monitorar o tratamento e avaliar possíveis falhas na terapia (AMERICAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF LIVER DISEASES, 2011; MACCARTHY, 2014).

### **Terapia antirretroviral de alta eficácia (HAART)**

Tem-se procurado obter o controle da infecção pelo HIV e retardar o aparecimento da AIDS por meio do tratamento com ARV. A HAART diminui a carga viral e aumenta qualitativa e quantitativamente as funções imunes do paciente, principalmente os linfócitos TCD<sub>4</sub><sup>+</sup>, diminuindo as complicações decorrentes da infecção e acarretando, então, uma melhora clínica geral (GRANICH et al., 2010). Devido ao uso da terapia, a morbidade e a mortalidade relacionadas à infecção vêm diminuindo significativamente, e já se pode dizer que a AIDS tornou-se uma doença crônica (WYATT et al., 2007).

O início da terapia antirretroviral aconteceu em 1987 com o uso da zidovudina (AZT), um análogo nucleosídeo, inibidor da transcriptase reversa (ITRN). Depois da introdução do AZT, outros análogos de nucleosídeos foram aprovados, porém, mesmo associações entre esses medicamentos não se mostraram suficientes para prevenir o surgimento de resistência do HIV à terapia (LABONTE; LEBBOS; KIRKPATRICK, 2003). Em 1995, o saquinavir passou a ser o primeiro inibidor da protease (IP) a tornar-se disponível nos Estados Unidos. No ano seguinte, foi licenciado o primeiro inibidor da transcriptase reversa não nucleosídeo (ITRNN), o nevirapina (CAMERON et al., 1998). Outros medicamentos da mesma linha dos anteriores foram licenciados nos anos seguintes para serem usados em associações (DE CLERCQ, 2010). O inibidor de fusão T-20 foi liberado em 2003 para uso em adultos e crianças maiores de seis anos que já tinham feito uso de outros ARV. Em 2007, foi aprovado o maraviroc, fármaco que impede que o vírus se ligue ao coreceptor CCR5, impossibilitando, assim, a sua entrada nas células (LABONTE; LEBBOS; KIRKPATRICK, 2003; DE CLERCQ, 2004; KURITZKES; KAR; KIRKPATRICK, 2008; DE CLERCQ, 2010). O raltegravir, fármaco inibidor da integrase (IIN), tornou-se, em 2007, o primeiro medicamento dessa classe a ser aprovado pelo Food And Drug Administration (FDA) para o tratamento de infecções pelo HIV-1 em combinação com outros ARV. Outro ITRNN, a etravirina, começou a ser usado em 2008 por pacientes que tinham variantes do vírus resistentes aos demais medicamentos desta classe (DEEKS et al., 2008; DE CLERCQ, 2010). O dolutegravir, também IIN, foi o último medicamento aprovado pelo FDA, em agosto de 2013 (FDA, 2013).

Existem, atualmente, mais de 30 medicamentos aprovados para o uso na HAART, os quais podem pertencer a uma das cinco classes de ARV existentes, ou seja, ITRNs, ITRNNs, IP, inibidores de entrada e de fusão e IIN, cada uma atuando de maneira diversa, a fim de evitar a replicação do vírus (ROBERT; MICHAEL; DOLAN, 2012) (Figura 3). Os ITRNs são pró-fármacos que necessitam de fosforilação para exercerem a sua função antiviral. São inibidores competitivos, sendo incorporados pela TR no DNA retrotranscrito, no lugar dos desoxiribonucleotídeos naturais, agindo, assim, como terminadores de cadeia (QUINONES-MATEU et al., 2008; MONNO; SCUDELLER; BRINDICCI, 2009). Os ITRNNs são pequenas moléculas de natureza hidrofóbica que inibem especificamente a TR do HIV-1 (SLUIS-CREMER; TEMIN; BAHAR, 2004) e agem diretamente sobre a enzima, interferindo na sua capacidade de converter RNA em cDNA (DE CLERCQ, 2008; MENENDEZ-ARIAS, 2009). Os IPs inibem a enzima competitivamente, impedindo a clivagem proteolítica e a consequente maturação do vírus. Da ação deste inibidor, resultam partículas virais imaturas, estruturalmente desorganizadas e incapazes de infectar novas células (KOHL et al., 1988;

HORNAK; SIMMERLING, 2007). Os IIN bloqueiam a enzima, impedindo a inserção do cDNA viral no genoma da célula hospedeira (KATLAMA; MURPHY, 2009). Os inibidores de entrada e os inibidores de fusão interferem na capacidade do vírus de ligar-se aos receptores na superfície externa da célula e fundir-se com a membrana celular, respectivamente (MENENDEZ-ARIAS, 2009).

Também já estão disponíveis multiclassas de medicamentos, ou seja, drogas compostas por duas ou mais classes em um único produto (NATIONAL INSTITUTE OF ALLERGY AND INFECTIOUS DISEASES, 2013). A terapia inicial, normalmente, combina três medicamentos, pertencentes a duas classes de ARV; dois ITRN e um terceiro com outro mecanismo de ação, como um ITRNN, IP ou IIN (RIDDLER et al., 2008; KOZAL et al., 2012). A genotipagem como ferramenta de detecção de resistência aos ARV ainda é realizada apenas em casos especiais, mas, dentre suas vantagens, destacam-se a possibilidade de escolha de esquemas antirretrovirais com maior chance de supressão viral, o uso de medicamentos ativos por períodos mais prolongados, o impedimento da toxicidade de medicamentos inativos e de trocas desnecessárias de do esquema de tratamento ARV. (TANG; SCHAFFER, 2012).

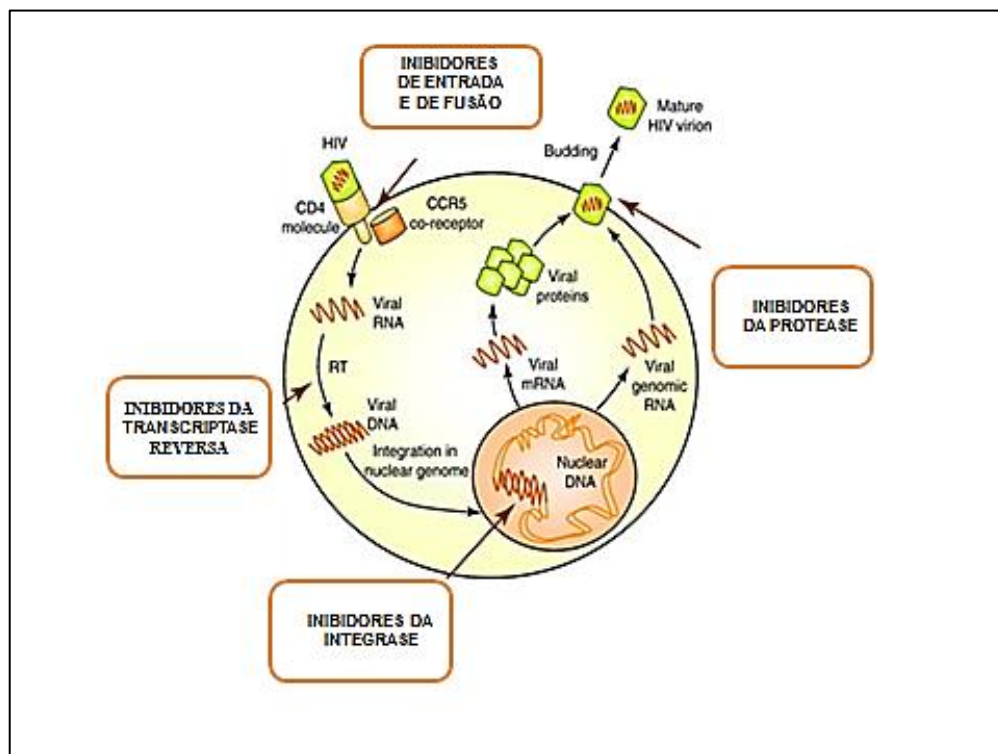


Figura 3 – Locais de ação dos antirretrovirais.

Fonte: Adaptado de APOSTOLOVA, 2011.

Apesar de a HAART ter diminuído significativamente a morbidade e a mortalidade relacionadas ao HIV/AIDS e prolongado a vida dos pacientes, ela não erradicou a infecção (DEEKS et al., 2012). O tratamento suprime o vírus mesmo a níveis indetectáveis, mas não consegue eliminá-lo totalmente do organismo. Mecanismos que mantêm o HIV-1 latente não estão completamente elucidados, mas sabe-se que os reservatórios virais desempenham papel fundamental. Esses reservatórios podem ser definidos como células ou sítios anatômicos em que o vírus persiste, como o sistema nervoso central e os tecidos linfoides associados ao intestino, locais não atingidos pela medicação (AMIJI; VYAS; SHAH, 2006; CHOMONT et al., 2009). A interrupção do tratamento e/ou o seu uso irregular, inevitavelmente, resulta na rápida recuperação da viremia e acelera o processo de resistência do vírus. Por isso, qualquer decisão acerca dos medicamentos deve ser tomada em acordo com médico que acompanha o soropositivo (VAN LINT; BOUCHAT; MARCELLO, 2013).

Desde o início do uso do primeiro antirretroviral, os protocolos de tratamento foram sendo alterados ao longo do tempo. No início, somente eram tratados os pacientes com contagens de linfócitos TCD<sub>4</sub><sup>+</sup> menores do que 350 células/mm<sup>3</sup> (BRASIL, 2008). Em 2012, o tratamento passou a ser indicado quando a contagem fosse menor do que 500 células/mm<sup>3</sup> (BRASIL, 2012). Atualmente, o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos, do Ministério da Saúde, recomenda que todas as pessoas portadoras de HIV/AIDS sejam estimuladas a iniciar imediatamente a HAART, independentemente da contagem de linfócitos TCD<sub>4</sub><sup>+</sup> (BRASIL, 2013c). Esta nova recomendação tem por objetivo a redução da transmissibilidade do HIV, uma vez que, quando conseguem-se níveis de carga viral indetectáveis nos fluídos biológicos, o risco de transmissão do vírus diminui em mais de 95% (MONTANER, 2013; RODGER et al., 2014). O paciente deve estar devidamente esclarecido sobre os benefícios e os riscos do uso das medicações e sobre a importância da regularidade da terapia (SABIN, 2013; FRANCO; SAAG, 2013).

Além das recomendações para pessoas infectadas, já existem indicações de profilaxia pré-exposição (PREP), ou seja, indicações para o uso diário de medicamentos ARV por pessoas não infectadas pelo HIV, mas que apresentam maior comportamento de risco e, com isso, estão mais expostas ao vírus. Os ensaios clínicos mostraram evidências de eficácia da terapia em casais heterossexuais sorodiscordantes e de alto risco, homens e mulheres transexuais que tem relações sexuais com outros homens e usuários de drogas injetáveis (GRANT et al., 2010, BAETEN et al., 2012; THIGPEN, 2012; CHOOPANYA et al., 2013).

No sentido de corrigir problemas existentes com a HAART, procurar novos alvos para tratar a infecção e encontrar uma vacina eficaz, muitos estudos estão sendo realizados. Novos esquemas terapêuticos com o objetivo de tratar os pacientes com menor número de medicamentos e buscar o mínimo de efeitos adversos vêm sendo desenvolvidos (DELFRAISSY et al., 2008; CAHN et al., 2014). Os nanomedicamentos podem ser, no futuro, uma alternativa para melhorar a terapia antirretroviral, por meio de medicamentos de liberação controlada, outras vias de administração, menor toxicidade e com a possibilidade de tornarem todos os reservatórios virais acessíveis (LENJISA; WOLDU; SATESSA, 2014). O CXCR4 também vem sendo alvo de estudos; modificações genéticas no correceptor para bloquear a entrada do vírus forneceriam uma nova estratégia não tóxica de combate à infecção (LIU et al., 2014). Além disto, estudos afim de desenvolver vacinas que estimulem a produção de anticorpos amplamente neutralizantes estão em andamento (HOFFENBERG et al., 2013; JARDINE et al., 2013; VAN BRAECKEL et al., 2013).

Contudo, apesar de todas as melhoras na qualidade de vida dos pacientes e dos benefícios incontestáveis da HAART, a AIDS ainda representa um problema de saúde pública, porque o acesso ao tratamento não é universal, os medicamentos não são curativos e apesar dos estudos, a previsão de uma vacina eficaz ainda é incerta (SHARP; HANN, 2011). Aliadas a isso estão as comorbidades que acometem os pacientes que estão envelhecendo com AIDS, a falha na adesão ao tratamento e os efeitos colaterais que acompanham a terapia. Os primeiros relatos dos efeitos colaterais envolvendo pacientes que utilizavam ARV datam de 1997. O FDA publicou, neste mesmo ano, um aviso sobre a associação do uso de inibidores da protease com o desenvolvimento do diabetes mellitus (FDA, 1997).

Os efeitos adversos que podem ser provocados pela terapia vão desde alterações hematológicas (neutropenia, leucopenia e anemia macrocítica), náuseas, vômitos, diarreia, alterações do apetite, cefaleia, febre, exantema, anorexia, fadiga, sintomas neurológicos, aumento das transaminases, pancreatite, nefrotoxicidade até hiperlipidemias, hiperbilirrubinemia, redistribuição da gordura corporal (conhecida como lipodistrofia), síndrome da resistência periférica à insulina e diabetes, dependendo da medicação utilizada (RACHID; SCHECHTER, 2008; BLAS-GARCIA; APOSTOLOVA; ESPLUGUES, 2011). Os pacientes infectados pelo HIV, mesmo com a HAART, ainda apresentam maiores índices de morbidade e mortalidade em relação às pessoas soronegativas da mesma idade (HSUE; DEEKS; HUNT, 2012; WADA, 2013). As complicações incluem câncer, declínio neurocognitivo, doenças do fígado, ósseas e vasculares (DEEKS; PHILLIPS, 2009). As causas não estão totalmente elucidadas e parecem ser multifatoriais, incluindo distúrbios



metabólicos, toxicidade da terapia e impacto primário da replicação viral, resultando na prevalência de doenças não relacionadas à AIDS, aterosclerose subclínica e disfunção endotelial (BARBARO, 2003; FRIIS-MOLLER, 2007; GRINSPOON, 2008; MASIA et al., 2013). É reconhecido que o endotélio possui função essencial na manutenção da saúde cardiovascular (FURCHGOTT; VANHOUTTE, 1989). Pessoas com HIV/AIDS têm a função endotelial prejudicada, e uma das principais causas de morbidade e mortalidade prematuras nestes pacientes são as complicações cardiovasculares (HO et al., 2012). Já foi demonstrado que o prejuízo da função endotelial envolve a formação de espécies reativas de nitrogênio e alteração na biodisponibilidade do óxido nítrico (WATTANAPITAYAKUL; BAUER, 2001).

### **Óxido nítrico**

Radicais livres (RL) são átomos ou moléculas que possuem um elétron desemparelhado, ou seja, ocupando um orbital sozinho. Esta condição os torna altamente reativos e muito instáveis, com grande capacidade de combinarem-se com as diversas estruturas integrantes das células. Já espécies reativas é uma expressão coletiva, que inclui também alguns não radicais, capazes de gerar RL. Assim, há as espécies reativas de oxigênio (EROs) e as espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000). As principais EROs distribuem-se em dois grupos, as radicalares: hidroxila ( $\text{HO}^\bullet$ ), superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), peroxila ( $\text{ROO}^\bullet$ ) e alcoxila ( $\text{RO}^\bullet$ ) e as não radicalares: oxigênio, peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e ácido hipocloroso. Entre as ERNs, incluem-se o óxido nítrico (NO), óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ), ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ) e peroxinitrito ( $\text{OONO}^-$ ) (ROBERTS; SINDHU, 2009). O metabolismo das ERNs, as quais, por estarem envolvidas em vários processos, desempenham papel fundamental no organismo, é iniciado pela formação do NO (NEDIANI et al., 2011).

O NO é um RL reativo e gasoso, que constitui uma das menores e mais simples moléculas conhecidas. Incolor e inorgânico, possui um elétron não pareado, reagindo, assim, facilmente com o oxigênio, o radical superóxido e os metais de transição, como ferro, cobalto, manganês e cobre (MONCADA; HIGGS, 1993). Este RL participa de uma variedade de mecanismos regulatórios dos sistemas biológicos, incluindo vasodilatação, controle da pressão sanguínea, agregação e inibição plaquetária, diminuição da produção de células musculares lisas e neurotransmissão. Além disso, apresenta atividades antimicrobianas e antitumorais (TORRE, PUGLIESE, SPERANZA, 2002; ZAHEDI, GHASEMI, AZIZI, 2008). Dependendo do meio em que se encontra, o NO pode ser oxidante ou redutor e difundir-se pelas membranas citoplasmáticas conforme o gradiente de concentração. Um aspecto

importante desta molécula é a sua capacidade de ser benéfica ou potencialmente tóxica, de acordo com a sua concentração ou depuração tecidual. A rápida oxidação do NO pelo oxigênio produz nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), metabólitos que podem ser convertidos de volta a NO por ação de substâncias redutoras (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001; YAMAGUCHI et al., 2006).

A óxido nítrico sintase (NOS) é a enzima que catalisa a biossíntese do NO, via oxidação da L-arginina, com a participação da forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) como um doador de elétron. Na primeira fase a L-arginina é hidroxilada a  $\text{N}^G$ -hidroxi-L-arginina por meio da utilização de uma molécula de oxigênio e duas de NADPH. A seguir, com um elétron proveniente do NADPH e outro da molécula de oxigênio, a  $\text{N}^G$ -hidroxi-L-arginina é convertida a L-citrulina e NO (GIULIVI, 2003) (Figura 4). Vários cofatores são requeridos para o funcionamento da enzima, incluindo tetrahydrobiopterina ( $\text{BH}_4$ ), NADPH, dinucleotídeo flavina adenina e mononucleotídeo flavina (NAPOLI; IGNARRO, 2009).

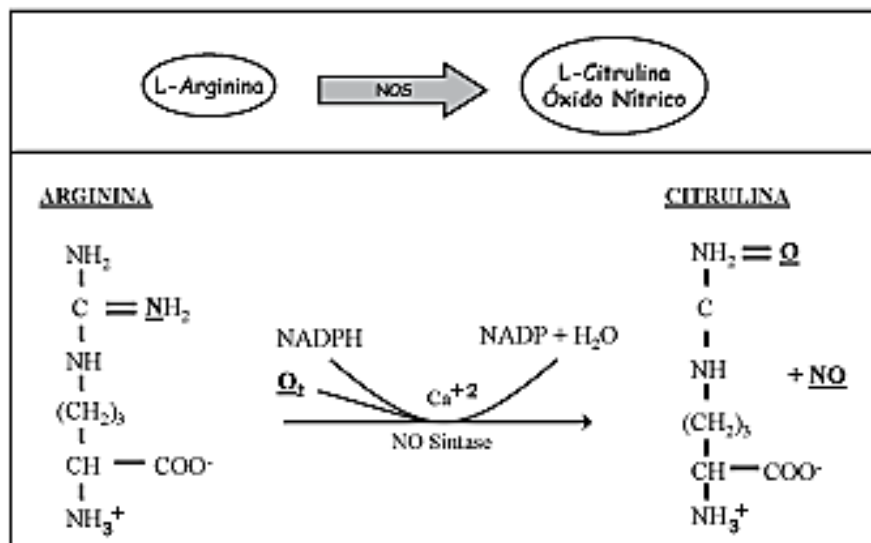


Figura 4 – Síntese do NO catalizada pela NOS.

Fonte: Adaptado de LEHNINGER (2002).

De acordo com a sua atividade, as NOS são classificadas em constitutivas (cNOS) e induzidas (iNOS) (STUEHR; POU; ROSEN, 2001). Além desta classificação, também são descritas como três isoformas, baseadas no sequenciamento de três genes diferentes: a NOS induzida, inflamatória ou tipo II (iNOS), a NOS neuronal ou tipo I (nNOS) e a NOS

endotelial ou tipo III (eNOS), estas duas últimas são constitutivas. (GROSS; WOLIN, 1995; MICHEL; FERON, 1997; SZABO; LIAUDET; SORIANO, 2000). As iNOS, capazes de sintetizar grandes quantias de NO por períodos relativamente longos, são liberadas por macrófagos independentemente da concentração intracelular de cálcio/calmodulina, poucas horas após sua ativação e também por outras células sob ação de citocinas (MONCADA; HIGGS, 1993). Este NO está intimamente ligado aos sistemas de defesa do organismo e relaciona-se aos processos destrutivos teciduais, à inflamação aguda ou crônica e à apoptose (TODA; IMAMURA; OKAMURA, 2010). As cNOS sintetizam pequenas quantidades de NO por períodos de tempo menor, e a liberação destas enzimas depende da concentração intracelular de cálcio/calmodulina. (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001). A nNOS gera NO, o qual responde por funções de neurotransmissão, atua sobre a neurogênese e memória e melhora a liberação de outros neurotransmissores e hormônios, além de auxiliar na regulação do trânsito intestinal. Há estudos no sentido de comprovar que a nNOS também está envolvida na regulação da pressão arterial (TORRE; PUGLIESE; SPERANZA, 2002; MELIKIAN et al, 2009; ZHOU; ZHU, 2009).

A eNOS encontrada nas células endoteliais é fundamental para combater a doença vascular. O NO proveniente da ação desta enzima mantém o tônus vascular, regula a pressão sanguínea, inibe a adesão e agregação plaquetárias, previne a adesão de monócitos e neutrófilos ao endotélio vascular e exerce ação antiproliferativa das células da camada vascular (TORRE; PUGLIESE; SPERANZA, 2002; PACHER; BECKMAN; LIAUDET, 2007; NAPOLI; IGNARRO, 2009). Com base na combinação destes efeitos, o NO endotelial provavelmente representa o mais importante princípio de defesa antiaterogênico na vasculatura (FÖRSTERMANN; MÜNZEL., 2006). A ativação da eNOS e a consequente síntese de NO pelas células endoteliais ocorre a partir de estímulos químicos ou físicos. Os estímulos químicos são gerados por substâncias como acetilcolina, bradicinina, adenosina difosfato, substância P e serotonina. Já os físicos são gerados pela força que o sangue exerce sobre a parede das artérias, denominada força de cisalhamento ou *shear stress* (BUSCONI, MICHEL, 1993; ZAGO; ZANESCO, 2006). Devido à característica lipofílica e ao seu pequeno tamanho, o NO produzido na célula endotelial difunde-se rapidamente na célula muscular e no lúmen vascular (MONCADA et al., 1991). No interior da célula muscular lisa, o NO reage com o ferro de heme proteínas ou com o ferro de proteínas sulfuradas, modulando, assim, a atividade de enzimas intracelulares críticas, como, por exemplo, a guanilato ciclase, que, na forma ativa, produz guanosina monofosfato cíclica (GMPc). A formação do GMPc

promove a ativação da bomba de cálcio dentro da célula muscular lisa, diminuindo as concentrações de cálcio intracelular, o que promoverá a redução do tônus vascular, isto é, o relaxamento dos vasos (VANHOUTTE, 1998; ZAGO; ZANESCO, 2006). Os potentes efeitos vasodilatadores do NO são estimulados por estes eventos bioquímicos, desencadeando os mecanismos de sinalização para estímulos da modulação do tônus vascular e do fluxo sanguíneo (COGGINS; BLOCH, 2007) (Figura 5).

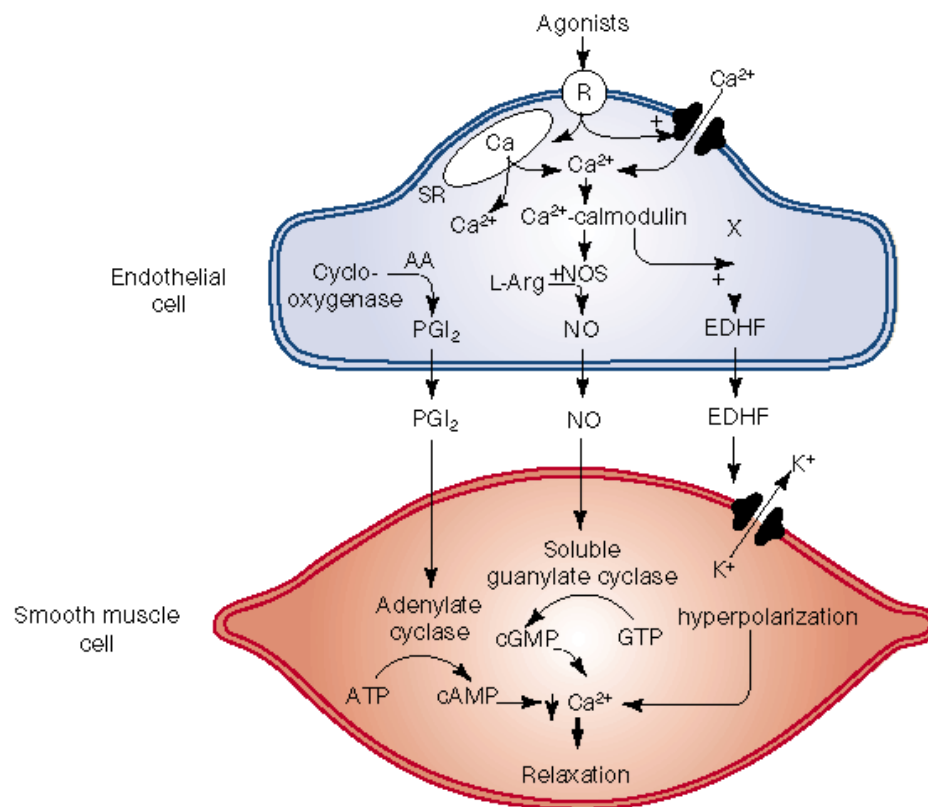


Figura 5 – Papel do NO no relaxamento vascular.

Fonte: Vanhoutte (1998).

Apesar do NO ser uma molécula importante para a manutenção vascular, trata-se de um RL. A depleção dos seus níveis e o dano celular acontecem quando, na presença de  $O_2^-$ , o NO é metabolizado a  $OONO^-$ . É possível observar, desse modo, que, em situações de estresse oxidativo (EO), o efeito benéfico do NO é suprimido, ocorrendo o impedimento de suas ações fisiológicas no endotélio vascular (HSICH et al., 2000). O EO ocorre quando há um desequilíbrio entre a quantidade de agentes pró-oxidantes e a capacidade de defesa antioxidante do organismo (BARREIROS; DAVID, 2006; CUERDA et al., 2011). A produção excessiva de espécies reativas ou os níveis baixos de antioxidantes tem sido

considerados importantes fatores no desenvolvimento da disfunção endotelial e aterogênese (HALLIWELL, 2001). Fortes evidências indicam que o EO participa dos processos de envelhecimento, transformação e morte celular, tendo consequência direta em várias patologias, tais como artrite, doenças do coração, catarata, disfunções cognitivas, câncer e AIDS, podendo ser a causa ou o fator agravante do quadro geral (VASCONCELOS, 2007). Estudos demonstraram que o EO está aumentado em pacientes infectados pelo HIV e é ainda maior naqueles submetidos à HAART (MOLLACE, SALVEMINI, RILEY, 2002; MANDAS et al., 2009). Pesquisas quanto ao envelhecimento precoce vêm sendo realizadas, no sentido de elucidar se este processo está ligado ao EO e à diminuição da função mitocondrial causados pelo próprio vírus ou é maior devido à medicação utilizada (SMITH et al., 2013).

Muitas patologias podem acontecer por defeitos na via do NO, entre elas, desordens no sistema nervoso central, diabetes mellitus, hipercolesterolemia, acidente vascular cerebral, aterosclerose, hipertensão arterial e insuficiência cardíaca, sendo que na maioria delas a disfunção endotelial está envolvida (NAPOLI et al., 2006). A redução da biodisponibilidade do NO, que leva à disfunção endotelial, é causada, principalmente, pelo aumento do  $O_2^-$  oriundo do EO. Este ânion desativa o NO para formar  $OONO^-$ , que é um potente oxidante e pode oxidar o cofator  $BH_4$ , levando ao fenômeno conhecido como “desacoplamento da enzima NOS”. Como resultado, ocorre a síntese de  $O_2^-$  pela NOS, ao invés da produção de NO (BECKMAN et al., 2001; CAPELLINI et al., 2010).

O endotélio desempenha papel fundamental na manutenção do tônus e da estrutura vascular e na homeostase sanguínea, além de produzir substâncias ativas, como o fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF), que é o próprio NO, o qual é considerado uma molécula antiaterosclerótica endógena e, portanto, importante nas doenças vasculares (DEANFIELD; HALCOX; RABELINK, 2007; JOHNSTONE et al., 1993). Disfunção endotelial é o termo utilizado para indicar redução da biodisponibilidade de vasodilatadores derivados do endotélio, um aumento local na concentração de substâncias antagonistas destes vasodilatadores ou estes dois fatores associados. Também compreende anormalidades nas interações do endotélio com leucócitos, plaquetas e substâncias reguladoras (ANDERSON, 1999; CARAMORI; ZAGO, 2000). A função endotelial alterada tem sido identificada como um marcador precoce de doença cardiovascular e pode prever a ocorrência de doença arterial coronariana, antes que as alterações ateroscleróticas sejam evidentes (DEANFIELD; HALCOX; RABELINK, 2007). Outro fator que pode estar envolvido na gênese da disfunção endotelial é a presença de inibidores endógenos da síntese do NO, como a dimetilarginina assimétrica (ADMA), que compete com a L-arginina na síntese do NO (JANG et al., 2011).

Uma vez que o NO tem meia-vida curta, a sua detecção torna-se difícil. Consequentemente, a determinação de seus metabólitos, NO<sub>x</sub>, é frequentemente utilizada (MOSHAGE et al., 1995). Existe uma forte correlação entre a produção endógena de NO e os níveis séricos de NO<sub>x</sub>, indicando que a determinação destes metabólitos inorgânicos parece ser a forma mais adequada para a quantificação da produção de NO endógeno (ROMITELLI et al., 2007). A reação colorimétrica de Griess, proposta em 1879, é a mais utilizada para mensurar os metabólitos do NO, devido ao seu custo-benefício, sendo uma técnica padrão para a determinação dos níveis do NO<sub>2</sub><sup>-</sup> inorgânico (DUSSE et al., 2005; ASL, GHASEMI, AZIZI, 2008). Ela é uma reação de diazotização, na qual o NO<sub>2</sub><sup>-</sup> reage com a sulfanilamida para produzir um íon diazônio, o qual, liga-se, então, ao N-(1-naftil) etilenodiamina, formando um cromóforo que apresenta um pico de absorbância em 540 nm (BRYAN; GRISHAM, 2007). A análise de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> pelo método de Griess requer a redução de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> em NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, antes da reação de diazotização, e a desproteinização de amostras séricas é necessária para evitar interferências na leitura espectrofotométrica (DUSSE et al., 2005). No método de Griess, um grande número de amostras pode ser processado em um curto espaço de tempo, o que torna este teste adequado para a rotina de laboratórios clínicos (TATSCH et al., 2011).

Apesar das abundantes evidências de que o endotélio desempenha papel fundamental na manutenção da saúde vascular e de que pacientes HIV positivos apresentam anormalidades vasculares, os mecanismos envolvidos não estão totalmente esclarecidos (BOGER, 2004; FORSTERMAN; MUNZEL, 2006; FURCHGOTT; VANHOUTTE, 2007). Já foi verificada uma diminuição significativa dos níveis de NO em função da expressão de proteínas do HIV-1 em ratos transgênicos (KLINE et al., 2008). Também já foi demonstrada menor NO exalado em pacientes infectados pelo HIV (PALM et al., 2000). Além disso, pacientes soropositivos, apresentaram níveis aumentados de ADMA (JANG et al., 2011; BAKER et al., 2012).

Estudos epidemiológicos mostram risco aumentado de eventos cardiovasculares em pacientes HIV positivos e, apesar de a HAART ter diminuído significativamente as taxas de mortalidade, as doenças não relacionadas à AIDS crescem nestes pacientes (GUARALDI et al., 2011; DEEKS; TRACY; DOUEK, 2013). Ademais, evidências sugerem que os inibidores de protease diminuem o NO endotelial e aumentam os riscos de alterações cardiovasculares (SHANKAR; DUBE, 2004; MONDAL et al., 2013). Entretanto, não são muitos os relatos referentes aos níveis séricos de NO<sub>x</sub> em pacientes HIV positivos e, o impacto da HAART sobre os metabólitos do NO ainda não foi reportado. Dessa forma, é de extrema relevância avaliar estes níveis em pacientes HIV positivos, bem como verificar a sua possível modificação devido à terapia antirretroviral.

# **ARTIGO - EVALUATION OF NITRIC OXIDE IN HIV INFECTION AND THE INFLUENCE OF ANTIRETROVIRAL THERAPY ON SERUM LEVELS OF NITRIC OXIDE METABOLITES**

**Evaluation of nitric oxide in HIV infection and the influence of antiretroviral therapy on serum levels of nitric oxide metabolites**

Running Head: Nitric Oxide levels in HIV-infected patients

Renata Mezomo Socal<sup>1,2</sup>, José Antonio Mainardi de Carvalho<sup>1,2,3</sup>, Guilherme Vargas Bochi<sup>3</sup>, Rafael Noal Moresco<sup>1,3</sup>, José Edson Paz da Silva<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Pharmaceutical Sciences Postgraduate Program, Health Sciences Center, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>2</sup>University Hospital, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>3</sup>Laboratory of Clinical Biochemistry, Department of Clinical and Toxicological Analysis, Health Sciences Center, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

\*Corresponding Author: José Edson Paz da Silva

Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Avenida Roraima 1000, Prédio 26, Sala 1216, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

Tel.: +55 55 32208940 Fax: +55 55 32208018

E-mail: jepazdasilva@gmail.com

## **Abstract**

**Objectives:** We investigated the levels of nitrite/nitrate (NO<sub>x</sub>) in HIV-infected patients and verified whether the levels of this marker would alter with antiretroviral therapy.

**Methods:** One hundred forty-seven volunteers were included in this case-control study. The subjects were divided into two groups: HIV-infected patients (n=101) and healthy subjects

(n=46). Then, the HIV-infected patients were divided into two groups: HIV-infected patients on highly active antiretroviral therapy (HAART) (n=83) and HIV-infected patients without HAART (n=18). Basic chemistry panel, fasting lipid profiles, serum NOx and red blood cell (RBC) indices were measured in all patients.

**Results:** It was demonstrated that HIV-infected patients had significantly lower NOx levels [62.4 (28.4-116.0)  $\mu\text{mol/L}$ ] than healthy individuals [86.8 (56.1-137.5)  $\mu\text{mol/L}$ ]. Multiple regression analysis showed that the alterations of NOx levels were independent of gender, liver enzymes, lipids and hematological parameters. Significant higher levels of RBC and platelet count in healthy controls were observed, while the RDW was higher in the HIV-infected patients. The healthy controls also had significantly higher levels of T-cholesterol and the HDL-cholesterol. Additionally, it was also found significantly lower NOx levels among treated [60.8 (27.9-105.4)  $\mu\text{mol/L}$ ] compared to untreated patients [127.0 (36.2-277.1)  $\mu\text{mol/L}$ ].

**Conclusions:** We present evidence that HIV-infected patients presented decreased NOx levels and, the HAART contributed to a higher decrease of these levels. These findings suggest that NOx level alterations may be an important mechanism that predisposes the HIV-infected patients to a cardiovascular onset. Thus, the maintenance of NOx levels may be a potential therapeutic strategy and, consequently, reduce cardiovascular diseases.

**Key words:** HIV, nitric oxide, HAART.

### **Introduction**

The human immunodeficiency virus (HIV) infects approximately 34.3 million people worldwide. In Brazil it is estimated that about 630 thousand people live with the virus. The infection is recognized as a chronic illness that requires lifelong therapy [1, 2]. Highly active antiretroviral therapy (HAART) has significantly reduced viral load, restored the immune system and extended the life expectancy of infected patients [3].

Even with effective therapy, HIV-infected patients treated with antiretroviral have excess risk of morbidity and mortality [4, 5]. These complications include cancer, liver illness, neurocognitive decline, bone disorders and vascular diseases [6]. The reasons have not yet been fully defined although they appear to be multifactorial and include metabolic derangements, toxicity from antiretroviral therapy and impact of primary viral replication, resulting in greater prevalence of the non-AIDS-related disease, subclinical atherosclerosis and endothelial dysfunction. [7- 9]. It is now recognized that the vascular endothelium plays an essential role in the maintenance of cardiovascular health [10]. HIV-infected patients have impaired endothelial function and one important cause of premature morbidity and mortality



are the cardiovascular complications [11]. In this context, it has been shown that endothelial cell impairment, *in vivo* and *in vitro*, may involve the formation of reactive nitrogen species and alter nitric oxide (NO) bioavailability [12].

NO is a free-radical gas, and is one of the simplest molecules known. It is formed as a reaction product of the conversion of L-arginine to citrulline through the hydroxylation of L-arginine guanidine nitrogen, and the NO synthase (NOS) is the enzyme that catalyzes the process. NO has been implicated in a wide variety of regulatory mechanisms in the cardiovascular system, including vascular tone, vascular structure, and cell-cell interactions in blood vessels [13]. Based on the combination of those effects, endothelial NO probably represents the most important antiatherogenic defense principle in the vasculature [14].

Several studies have been conducted to elucidate the role of NO in vascular diseases [12-14]. However, there are few reports showing the levels of NO<sub>x</sub> in HIV-infected patients. Furthermore, the relationship between the impacts of HAART on levels of NO<sub>x</sub> has not been reported previously. In this context, the main purpose of the present study was to evaluate serum NO<sub>x</sub> levels in HIV-infected patients and verify whether the levels of this marker alter with antiretroviral therapy.

## **Methods**

### *Study population*

One hundred forty-seven volunteers were included in this case-control study. The subjects were divided into two groups: HIV-infected patients, with at least one year of infection (n=101) and healthy subjects (n= 46). Then, in order to assess the impact of therapy, the HIV-infected patients were divided into two groups: HIV-infected patients on HAART, treated for at least 6 months (n=83) and HIV-infected patients without HAART (n=18). HIV-infected patients were recruited from the Infectious Diseases Ambulatory from University Hospital of Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil, and the subjects of control group were recruited in the same city. Patients' medical charts were reviewed regarding their previous and current HIV medical history. The exclusion criteria included pregnancy, malignant disease, and chronic renal failure. All eligible subjects provided informed written consent, and all studies were conducted in accordance with guidelines approved by the local research ethics committee (number 14741113.0000.5346).

### *Laboratory assays*

Basic chemistry panel and fasting lipid profiles were measured in all subjects. Blood samples were collected after an overnight fast by venous puncture technique into Vacutainer® (BD

Diagnostics, Plymouth, UK) tubes with EDTA or no anticoagulant. Serum, routinely centrifuged at 2500 x g for 15 min, was used to assess the levels of glucose, total cholesterol, HDL-cholesterol, triglycerides, alanine amino transferase (ALT) and aspartate amino transferase (AST). Biochemical measurements were performed by use of standard methods on Dimension RxL Max Integrated Chemistry System<sup>®</sup> (Siemens Diagnostics, Berlin, Germany). LDL- cholesterol was estimated with the Friedewald equation [15]. Serum nitrite/nitrate (NOx) was measured on Cobas MIRA<sup>®</sup> automated analyzer (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) by a method previously described and validated by Tatsch *et al* [16].

Whole blood with EDTA was used to assess CD4, CD8, CD3, CD45 cells and these measurements were performed by use of flow cytometry on BD FACSCalibur<sup>®</sup> (Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, USA). The RBC indices, including white blood cell (WBC), red blood cell (RBC), hemoglobin, hematocrit, red blood cell distribution width (RDW), platelet count and mean platelet volume (VPM) were assessed on XE-5000 - Hematology-Analyzer<sup>®</sup> (Sysmex Diagnostics, Kobe, Japan). Plasma EDTA was used to assess HIV viral load on m2000 Real Time System<sup>®</sup> (Abbott Molecular, Illinois, USA) by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay, which quantifies HIV type 1, Group M, subtypes A—H, Group O and Group N, with the lower limit of quantification of 40 copies/L.

#### *Statistical analysis*

Data are presented as mean and standard deviation (SD) or median and interquartile-range. The categorical data was summarized as percentage, and comparisons between groups were performed with the Chi-square test. Statistical differences between groups were evaluated by Student's test or Mann-Whitney. The Kolmogorov-Smirnov test was used to verify the normal distribution of variables. Multiple regression analysis was used to investigate whether some factors interfere in NOx levels. Statistical significance was assumed at  $P < 0.05$ . Data were analyzed using Graph Pad Prism version 4.00 for Windows (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA) and Statistic 6.0 (Stat Soft Inc., Tulsa, OK, USA).

#### **Results**

Baseline characteristics of the participants of this study and analyzed parameters are described in Table 1. The HIV-infected patients had significantly higher levels of liver enzymes, while the healthy controls had significantly higher levels of T- cholesterol and the HDL-cholesterol. No significant differences were observed for glucose, creatinine, LDL-cholesterol and

triglycerides. RBC and platelet counts were significantly higher in healthy controls, and RDW was higher in the HIV-infected patients. No significant differences were observed for WBC, hemoglobin, hematocrit and VPM. It was also demonstrated that HIV-infected patients had significantly lower NOx levels [62.4 (28.4-116.0)  $\mu\text{mol/L}$ ] than healthy individuals [86.8 (56.1-137.5)  $\mu\text{mol/L}$ ]. As presented in Table 2, multiple regression analysis showed that the alterations of NOx levels were independent of gender, liver enzymes, lipids and hematological parameters, and the levels of NOx remained independent when all confounding variables were grouped.

Baseline characteristics of the HIV-infected patients based on treatment are described in Table 3. Hemoglobin and HDL-cholesterol were significantly higher in treated patients. Interestingly, serum NOx levels were significantly lower in treated patients [60.8(27.9-105.4) $\mu\text{mol/L}$ ] compared to the untreated group [127.0(36.2-277.1) $\mu\text{mol/L}$ ]. There were no significant differences for CD4, CD8, CD3 and CD45 cells counts. However, a significant higher level of the ratio CD4/CD8 ratio was observed in the treated patients. In addition, viral load was significantly lower in treated patients, while 73.5% of those treated had viral load below the minimum limit; only 16.7% of those untreated had the same indices.

Please add **Table 1** here

Please add **Table 2** here

Please add **Table 3** here

## Discussion

The major finding of the present study was the association between HIV infection and serum levels of NOx. In this study, we demonstrated that NOx decreased in HIV syndrome. Although the alterations of NO have been associated with HIV infection [17], to the best of our knowledge, this study is the first attempt to check whether NOx levels are decreased in HIV-infected patients using multiple regression analysis and whether HAART modifies these levels. In this context, we also demonstrated that the HAART induced a decrease in NOx levels of HIV-infected patients. Interestingly enough, based on this finding, we can speculate that the virus infection mechanism may involve alterations of NO metabolism, and this process may contribute to an impairment of endothelial function and consequently, a higher cardiovascular risk.

There is abundant evidence that the endothelium plays a crucial role in the maintenance of vascular tone and NO is the major endothelium-derived vasoactive mediators [10, 14, 18]. In addition, HIV infection is recognized as a chronic illness, to which the endothelium

dysfunction is associated [19]. Despite substantial evidence of vascular abnormalities in HIV patients being reported, the mechanisms involved in this process are not completely known [20]. Moreover, the role of NO in HIV infection is contradictory, and the protective and toxic effects of NO may be seen in parallel [21]. In this study, we demonstrated that HIV-infected patients had significantly lower NOx levels, and the association between HIV-infection and NOx were independent of gender, liver enzymes, lipids and hematological parameters. Several studies have shown that NO bioavailability from the endothelium is a critical component of vascular homeostasis [12, 14, 22]. In this context, decreased NO bioavailability disrupts vascular homeostasis and enhances the risk of developing cardiovascular disease. Kline *et al.* (2008) demonstrated a dramatic decrease in aortic tissue NO levels as well as NO metabolites in the blood, and these results were due to HIV-1 protein expression in the HIV-1 transgenic rats [23]. In addition, it was shown that HIV-1 infected patients have significantly less exhaled NO than uninfected individuals [24, 25]. NO deficiencies were also observed in HIV-1 infected patients with pulmonary tuberculosis and toxoplasmic encephalitis [26, 27]. Agreeing with these studies, plasma levels of asymmetric dimethyl arginine (ADMA), an endogenous inhibitor of NOS, were increased in HIV-1 infected patients compared to uninfected ones. ADMA, which is inversely associated with flow mediated endothelium-dependent vasodilation, has been found to cause endothelial dysfunction and has been shown to independently predict future cardiovascular deaths [28-32].

Epidemiological studies have reported greater risk for cardiovascular events among HIV-infected compared with uninfected individuals [33-35]. The etiology of these abnormalities is not well established [36, 37]. HIV-1-associated cardiovascular disease progression is a multifactorial process, resulting from a combination of viral proteins interacting through distinct pathways [23, 38]. Besides injury to the endothelium, the HIV infection has a profound impact on blood lipids. The primary lipoprotein alteration related to untreated HIV infection is a decline in HDL-cholesterol [39]. Recently, Mujawar *et al.* (2006) demonstrated that viral proteins may be responsible for decreased production of HDL-cholesterol [40]. In agreement with these findings, our study also demonstrated that the levels of HDL-cholesterol are significantly lower in HIV-infected patients, compared to healthy controls. It is very consistent and known the inverse relations between the HDL-cholesterol and adverse cardiovascular outcomes [41]. Furthermore, our study additionally indicated that RDW is higher in HIV-infected patients. The RDW is a numerical measure of the variability in size of circulating erythrocytes. Increased RDW values reflect greater heterogeneity in red blood cell size (anisocytosis), which is usually caused by alterations in erythrocyte maturation or

degradation [42]. Interestingly, it was recently demonstrated that higher levels of RDW increase the risk of mortality and adverse cardiovascular outcomes [43]. Therefore, we speculate that all metabolic derangements presented in HIV infection may be involved in an increased cardiovascular risk, including HDL-cholesterol, NO<sub>x</sub> and RDW changes.

Despite antiretroviral therapy having dramatically decreased mortality by HIV, patients still had to live with multiple comorbidities [44, 45]. These non-AIDS-related events include aging, neurocognitive disorders, renal disease, liver disease and, mainly, cardiovascular disease [45, 46]. Severe side effects are associated with chronic HAART, including endothelial dysfunction. Some studies suggest that some types of antiretroviral may be associated with increased risk of cardiovascular and, although the mechanisms are unclear, the vascular endothelium plays an important role in maintenance of cardiovascular health [10, 47]. Shankar *et al.* (2004) demonstrated that protease inhibitor (PI) reduces endothelial NO and enhances endothelial dysfunction in healthy HIV-1-negative men [48]. Another piece of evidence suggests an increased risk of myocardial infarction in HIV-infected patients by use of protease inhibitors [49]. Moreover, Islan *et al.* (2012) found that the risk of cardiovascular disease for treated patients was two times greater than the risk for untreated patients [35]. Interestingly, our study found lower NO<sub>x</sub> levels in HIV-infected patients treated than untreated, which may contribute to cardiovascular events. Recently, it was shown that a potent PI suppressed the NO production in human aortic endothelial cells and the treatment with insulin sensitizers was able to protect against PI-mediated endothelial dysfunction [49].

In summary, we were able to show that HIV-infected patients presented decreased NO<sub>x</sub> levels and, the HAART contributed for a higher decrease of these levels. It must be emphasized that these NO<sub>x</sub> level alterations may be an important mechanism that predisposes the HIV-infected patients to a cardiovascular onset. Although the survival of HIV-infected patients has improved effectively with HAART, these patients are at substantially greater risk of developing other comorbidities, specially, cardiovascular conditions. In this context, strategies to suppress the HIV virus and HAART deleterious effects need to be developed. Thus, the maintenance of NO levels may be a potential therapeutic strategy and, consequently, reduce the risk of cardiovascular diseases.

### **Acknowledgments**

This study was supported by scholarships from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES Brazil).

## References

1. Pere D, Ignacio SL, Ramon T *et al.* Dyslipidemia and Cardiovascular Disease Risk Factor Management in HIV-1- Infected Subjects Treated with HAART in the Spanish VACH Cohort. *Open AIDS J* 2008; **2**: 26-38.
2. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). AIDS Info. <http://www.unaids.org/en/data analysis/data tools/aids info/>.
3. Hung CC, Chang SC. Impact of highly active antiretroviral therapy on incidence and management of human immunodeficiency virus-related opportunistic infections. *J Antimicrob Chemother* 2004; **54**: 849-853.
4. Hsue PY, Deeks SG, Hunt PW. Immunologic Basis of Cardiovascular Disease in HIV-Infected Adults. *JID* 2012; **205**: 375-376.
5. Wada N, Jacobson LP, Cohen M, French A, Phair J, Muñoz A. Cause-Specific life expectancies after 35 years of age for human immunodeficiency syndrome-infected and human immunodeficiency syndrome-negative individuals followed simultaneously in long-term cohort studies, 1984–2008. *Am J Epidemiol* 2013; **177**: 116-125.
6. Deeks SG, Phillips AN. HIV infection, antiretroviral treatment, ageing, and non-AIDS related morbidity. *BMJ* 2009; **338**: a3172.
7. Barbaro G. HIV infection, highly active antiretroviral therapy and the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 2003; **60**: 87-95.
8. Grinspoon SK, Grunfeld C, Kotler DP *et al.* State of the science conference: initiative to decrease cardiovascular risk and increase quality of care for patients living with HIV/AIDS: executive summary. *Circulation* 2008; **118**: 198-210.
9. Friis-Moller N, Reiss P, Sabin CA *et al.* Class of antiretroviral drugs and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med* 2007; **356**: 1723-35.
10. Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J* 1989; **3**: 2007-2018.
11. Ho JE, Scherzer R, Hecht FM, Maka K, Selby V, Martin JN *et al.* The Association of CD4+ T-Cell Count on Cardiovascular Risk in Treated HIV Disease. *AIDS* 2012; **26**: 1115-1120.
12. Wattanapitayakul SK, Bauer JA. Oxidative pathways in cardiovascular disease: roles, mechanisms, and therapeutic implications. *Pharmacol Ther* 2001; **89**: 187-206.
13. Moncada S, Higgs EA. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; **329**: 2002-2012.

14. Förstermann U, Münzel T. Endothelial Nitric Oxide Synthase in Vascular Disease: From Marvel to Menace. *Circulation* 2006; **113**: 1708-1714.
15. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; **18**: 499-502.
16. Tatsch E, Bochi GV, Pereira RS, Kober H, Agertt VA, Campos MM, Gomes P, Duarte MM, Moresco RN. A simple and inexpensive automated technique for measurement of serum nitrite/nitrate. *Clin Biochem* 2011; **44**: 348-50.
17. Torre D, Pugliese A, Speranza F. Role of nitric oxide in HIV-1 infection: friend or foe? *The Lancet Infectious Diseases* 2002; **2**: 273-80.
18. Boger RH. Asymmetric Dimethyl arginine, an Endogenous Inhibitor of Nitric Oxide Synthase, Explains the “L-Arginine Paradox” and Acts as a Novel Cardiovascular Risk Factor. *J Nutr* 2004; **134**: 2842S-2847S.
19. Ross AC, Rizk N, O’Riordan MA, Dogra V, El-Bejjani D, Storer N *et al.* Relationship between inflammatory markers, endothelial activation markers, and carotid intima-media thickness in HIV infected patients receiving antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* 2009; **49**: 1119-1127.
20. Zangerle R, Fuchs D, Reibnegger G *et al.* Serum nitrite plus nitrate in infection with human immunodeficiency virus type 1. *Immunobiology* 1995; **193**: 59-70.
21. Groeneveld PHP, Kroon FP, Nibbering PH, Bruisten SM, Van Swieten P, Van Furth R. Increased production of nitric oxide correlates with viral load and activation of mononuclear phagocytes in HIV-infected patients. *Scand J Infect Dis* 1996; **28**: 341-345.
22. Wattanapitayakul SK, Weinstein DM, Holycross BJ, Bauer JA. Endothelial dysfunction and peroxynitrite formation are early events in angiotensin-induced cardiovascular disorders. *FASEB J* 2000; **14**: 271-278.
23. Kline ER, Kleinhenz DJ, Liang B *et al.* Vascular oxidative stress and nitric oxide depletion in HIV-1 transgenic rats are reversed by glutathione restoration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; **294**: H2792–H2804.
24. Loveless MO, Phillips CR, Giraud GD, Holden WE. Decreased exhaled nitric oxide in subjects with HIV infection. *Thorax* 1997; **52**: 185-186.
25. Palm J, Lidman C, Graf P, Alving K, Lundberg J. Nasal nitric oxide is reduced in patients with HIV. *Acta Otolaryngol* 2000; **120**: 420-423.

26. Schon T, Gebre N, Sundqvist T, Aderaye G, Britton S. Effects of HIV co-infection and chemotherapy on the urinary levels of nitric oxide metabolites in patients with pulmonary tuberculosis. *Scand J Infect Dis* 1999; **31**: 123-126.
27. Torre D, Zeroli C, Ferrario G *et al.* Levels of nitric oxide, gamma interferon and interleukin-12 in AIDS patients with toxoplasmic encephalitis. *Infection* 1999; **27**: 218-220.
28. Janga JJ, Berkheimer SB, Merchant M, Krishnaswami A. Asymmetric dimethylarginine and coronary artery calcium scores are increased in patients infected with human immunodeficiency virus. *Atherosclerosis* 2011; **217**: 514- 517.
29. Kurza K, Teerlink T, Sarcelletti M *et al.* Plasma concentrations of the cardiovascular risk factor asymmetric dimethylarginine (ADMA) are increased in patients with HIV-1 infection and correlate with immune activation markers. *Pharmacological Research* 2009; **60**: 508-514
30. Solages A, Vita JA, Thornton DJ *et al.* Endothelial function in HIV-infected persons. *Clin Infect Dis* 2006; **42**: 1325-1332.
31. Jang JJ, Berkheimer SB, Merchant M, Krishnaswami A. Asymmetric dimethylarginine and coronary artery calcium scores are increased in patients infected with human immunodeficiency virus. *Atherosclerosis* 2011; **217**: 514-517.
32. Baker JV, Neuhaus J, Duprez D, Freiberg M, Bernardino JJ, Badley AD *et al.* HIV Replication, Inflammation, and the Effect of Starting Antiretroviral Therapy on Plasma Asymmetric Dimethylarginine, a Novel Marker of Endothelial Dysfunction. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2012; **60**: 128-134.
33. Triant VA, Lee H, Hadigan C, Grinspoon SK. Increased acute myocardial infarction rates and cardiovascular risk factors among patients with human immunodeficiency virus disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; **92**: 2506-2512.
34. Phillips AN, Neaton J, Lundgren JD. The role of HIV in serious diseases other than AIDS. *AIDS* 2008; **22**: 2409-2418.
35. Islam FM, Wu J, Jansson J, Wilson DP. Relative risk of cardiovascular disease among people living with HIV: a systematic review and meta-analysis. *HIV Medicine* 2012; **13**: 453-468.
36. Hoa JE, Scherzer R, Hecht FM *et al.* The Association of CD4+ T-Cell Count on Cardiovascular Risk in Treated HIV Disease. *AIDS* 2012; **26**: 1115-1120.
37. Baker JV, Lundgren JD. Cardiovascular implications from untreated human immunodeficiency virus infection. *Eur Heart J* 2011; **32**: 945-951.



38. Samuel M, Jose S, Winston A, Nelson M, Johnson M, Chadwick D *et al.* The effects of age on associations between markers of HIV progression and markers of metabolic function including albumin, hemoglobin and lipid concentrations. *HIV Medicine* 2014; **15**: 311-316.
39. Riddler SA, Smit E, Cole SR *et al.* Impact of HIV infection and HAART on serum lipids in men. *JAMA* 2003; **289**: 2978-2982.
40. Mujawar Z, Rose H, Morrow MP *et al.* Human immunodeficiency virus impairs reverse cholesterol transport from macrophages. *PLoS Biol* 2006; **4**: e365.
41. Kaur N, Pandey A, Negi H, Shafiq N, Reddy S *et al.* Effect of HDL-Raising Drugs on Cardiovascular Outcomes: A Systematic Review and Meta-Regression. *PLoS ONE* 2014; **9**: e94585.
42. Patel KV, Ferrucci L, Ershler WB, Longo DL, Guralnik JM. Red blood cell distribution width and the risk of death in middle-aged and older adults. *Arch Intern Med* 2009; **169**: 515-523.
43. Sangoi MB, Da Silva SH, Silva JEP, Moresco RN. Relation between red blood cell distribution width and mortality after acute myocardial infarction. *Cardiol Int J* 2011; **146**: 278-80.
44. Guaraldi G, Orlando G, Zona S, Menozzi M, Carli F *et al.* Premature age-related comorbidities among HIV-infected persons compared with the general population. *Clin Infect Dis* 2011; **53**: 1120-1126.
45. Deeks SG, Tracy R, Douek DC. Systemic Effects of Inflammation on Health during Chronic HIV Infection. *Immunity* 2013; **39**: 633-645.
46. Serrano-Villar S, Perez-Elias MJ, Drona F, Casado JL, Moreno A *et al.* Increased Risk of Serious Non-AIDS-Related Events in HIV-Infected Subjects on Antiretroviral Therapy Associated with a Low CD4/CD8 Ratio. *PLoS ONE* 2014; **9**: e85798.
47. Bavinger C, Bendavid E, Niehaus K, Olshen RA, Olkin I *et al.* Risk of Cardiovascular Disease from Antiretroviral Therapy for HIV: A Systematic Review. *PLoS ONE* 2013; **8**: e59551.
48. Shankar SS, Dube MP. Clinical aspects of endothelial dysfunction associated with human immunodeficiency virus infection and antiretroviral agents. *Cardiovasc Toxicol* 2004; **4**: 261-269.
49. Mondal D, Liu K, Hamblin M, Lasky JA, Agrawal KC. Nelfinavir Suppresses Insulin Signaling and Nitric Oxide Production by Human Aortic Endothelial Cells: Protective Effects of Thiazolidinediones. *The Ochsner Journal* 2013; **13**: 76-90.

**Table 1.** Baseline characteristics of the study population.

	<b>Control</b>	<b>HIV</b>	<b>P-value</b>
Age (years)	40.9 ± 10.8	40.7 ± 12.2	0.9150
Male (%)	30.4	54.5	0.0070
Glucose (mg/dL)	91.7 ± 11.7	95.6 ± 16.1	0.1426
Creatinine (mg/dL)	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.2	0.8999
T- cholesterol (mg/dL)	197.3 ± 31.7	180.5 ± 43.8	0.0207
LDL- cholesterol (mg/dL)	117.9 ± 34.9	109.6 ± 35.9	0.1960
HDL- cholesterol (mg/dL)	56.6 ± 13.8	43.4 ± 12.7	<0.001
Triglycerides (mg/dL)	112.2 ± 67.1	143.1 ± 116.3	0.0946
ALT (U/L)	29.5 (24.0–38.0)	33.0 (26.0–50.0)	0.0447
AST (U/L)	19.0 (16.0–23.0)	22.0 (18.0–33.5)	0.0057
WBC (10 <sup>3</sup> cells/μL)	6.7 ± 1.6	6.2 ± 2.1	0.1586
RBC (10 <sup>6</sup> cells/μL)	4.6 ± 0.4	4.1 ± 0.7	<0.001
Hemoglobin (g/dL)	13.8 ± 1.1	13.6 ± 1.7	0.5023
Hematocrit (%)	40.8 ± 3.0	39.8 ± 4.5	0.1576
RDW (%)	13.0 (12.7–13.4)	13.5 (13.1–14.2)	0.0026
Platelet (10 <sup>3</sup> cells/μL)	235.4 ± 46.4	214.5 ± 61.9	0.0424
VPM (fL)	10.2 ± 1.0	9.9 ± 0.8	0.0664
NOx (μmol/L)	86.8 (56.1–137.5)	62.4 (28.4–116.0)	0.0461

Data are expressed as percentages, mean and SD or median (interquartile range).

**Table 2.** Multiple regression analysis of NOx as a dependent variable adjusting for gender, lipids, hematological parameters and liver enzymes in healthy subjects and HIV positive.

	<i>b</i>	SE <sub><i>b</i></sub>	<i>t</i>	<i>P</i> -value
<b>Gender</b>	0.069	0.083	0.836	0.404
<b>Lipids</b>				
Total cholesterol (mg/dL)	0.119	0.084	1.413	0.159
HDL-cholesterol (mg/dL)	-0.108	0.085	-1.282	0.201
<b>Hematological parameters</b>				
RBC (10 <sup>6</sup> cells/μL)	-0.008	0.044	0.201	0.840
RDW (%)	0.058	0.084	0.180	0.856
Platelet (10 <sup>3</sup> cells/μL)	0.044	0.088	0.505	0.614
VPM (fL)	-0.050	0.087	-0.574	0.566
<b>Liver enzymes</b>				
ALT (U/L)	-0.051	0.126	-0.407	0.684
AST (U/L)	0.134	0.127	1.057	0.292
<b>All variables</b>				
Gender (%)	0.060	0.086	0.687	0.492
Total cholesterol (mg/dL)	0.142	0.090	1.574	0.117
HDL-cholesterol (mg/dL)	-0.130	0.090	-1.436	0.153
RBC (10 <sup>6</sup> cells/μL)	0.050	0.087	0.562	0.574
RDW (%)	0.017	0.086	0.203	0.839
Platelet (10 <sup>3</sup> cells/μL)	0.074	0.094	0.786	0.432
VPM (fL)	-0.001	0.089	-0.015	0.987
ALT (U/L)	-0.086	0.135	-0.639	0.523
AST (U/L)	0.215	0.136	1.586	0.114

Regression coefficients (*b*), standard error of *b* (SE<sub>*b*</sub>), and *t* statistic with corresponding *P*-value.

**Table 3.** Baseline characteristics of HIV- untreated and HIV-treated patients.

	<b>HIV- untreated</b>	<b>HIV-treated</b>	<b>P-value</b>
Age (years)	39.2 ± 10.7	41.1 ± 12.5	0.5493
Male (%)	50.0	55.4	0.6754
Glucose (mg/dL)	96.8 ± 19.0	95.3 ± 15.5	0.7164
Creatinine (mg/dL)	0.8 ± 0.2	0.9 ± 0.2	0.3878
Total cholesterol (mg/dL)	165.3 ± 43.9	183.8 ± 43.4	0.1047
LDL- cholesterol (mg/dL)	96.5 ± 31.1	112.1 ± 36.4	0.1119
HDL- cholesterol (mg/dL)	38.1 ± 10.2	44.6 ± 12.9	0.0483
Triglycerides (mg/dl)	143.0 ± 123.9	143.2 ± 115.4	0.9953
ALT (U/L)	32.5 (24.0–51.5)	33.0 (26.0–51.0)	0.5934
AST (U/L)	26.0 (17.5–40.5)	22.0 (18.0–32.0)	0.9613
WBC (10 <sup>3</sup> cells/μL)	6.3 ± 1.8	6.2 ± 2.2	0.8088
RBC (10 <sup>6</sup> cells/μL)	4.2 ± 0.8	4.1 ± 0.6	0.3665
Hemoglobin (g/dl)	12.8 ± 1.9	13.7 ± 1.6	0.0224
Hematocrit (%)	38.2 ± 5.5	40.1 ± 4.2	0.1291
RDW (%)	13.9 (13.1–14.4)	13.5 (13.1–14.3)	0.7260
Platelet (10 <sup>3</sup> cells/μL)	218.6 ± 48.1	213.6 ± 64.8	0.7559
VPM (fL)	10.1 ± 0.5	9.9 ± 0.8	0.3405
CD4(cells/μL)	406.7 ± 292.8	545.2 ± 287.7	0.0678
CD8(cells/μL)	963.4 ± 499.2	956.0 ± 543.2	0.9576
CD4/CD8 ratio	0.4 ± 0.3	0.6 ± 0.3	0.0117
NOx (μmol/L)	127.0 (36.2–277.1)	60.8 (27.9–105.4)	0.0294

Data are expressed as percentages, mean and SD or median (interquartile range).

## **CONCLUSÕES**

Foi demonstrado que os pacientes infectados pelo HIV apresentaram diminuição dos níveis séricos de NOx e, a HAART contribuiu para uma queda maior desses níveis. Deve ser enfatizado que esta diminuição pode ser um mecanismo importante que predispõe os pacientes infectados pelo HIV à um desfecho cardiovascular. Embora os benefícios da HAART sejam indiscutíveis, pacientes HIV positivos ainda apresentam maior número de comorbidades, em especial, as doenças cardiovasculares. Neste contexto, ações que melhorem a qualidade de vida das pessoas com HIV/AIDS precisam ser desenvolvidas. Assim, a manutenção dos níveis de NOx pode ser uma potencial estratégia terapêutica e, consequentemente, reduzir o risco de doenças cardiovasculares.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Cellular and Molecular Immunology**. 4. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2000.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia Básica-Funções e Distúrbios do Sistema Imunológico**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochemistry Journal**, v. 357, p. 593-615, 2001.

AMERICAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF LIVER DISEASES. AASLD Practice Guideline, **Hepatology**, v. 53, p. 1020-1022, 2011.

AMIJI, M. M.; VYAS, T. K.; SHAH, L. K. Role of nanotechnology in HIV/AIDS treatment: potential to overcome the viral reservoir challenge. **Discovery Medicine**, v. 6, p. 157-162, 2006.

ANDERSON, T. J. Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 34, p. 631-637, 1999.

APOSTOLOVA, N. et al. Mitochondrial interference by anti-HIV drugs: mechanisms beyond Pol- $\gamma$  inhibition. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.32, p. 715-735, 2011.

ARIEN, K. K. et al. The replicative fitness of primary human immunodeficiency virus type1 (HIV-1) group M, HIV-1 group O, and HIV-2 isolates. **Journal of Virology**, v. 79, p. 8979-8990, 2005.

ASL, A. Z.; GHASEMI, A.; AZIZI, F. Serum nitric oxide metabolites in subjects with metabolic syndrome. **Clinical Biochemistry**, v. 41, p. 1342-1347, 2008.

BAER, M.; ROBERTS, J. Complex HIV treatment regimens and patient quality of life. **Canadian Psychology**, v. 43, p. 115-121, 2002.

BAETEN, J. M. et al. Antiretroviral prophylaxis for HIV prevention in heterosexual men and women. **New England Journal of Medicine**,v. 367, p. 399-410, 2012.

BAKER, J. V. et al. HIV Replication, Inflammation, and the Effect of Starting Antiretroviral Therapy on Plasma Asymmetric Dimethylarginine, a Novel Marker of Endothelial Dysfunction. **Journal Acquire Immune Deficiency Syndrome**, v. 60, p. 128-134, 2012.

BALTER, M. Europe: AIDS research on a budget. **Science**, v. 280, p. 1856-1858, 1998.

BARBARO, G. HIV infection, highly active antiretroviral therapy and the cardiovascular system. **Cardiovascular Research**, v. 60, p. 87-95, 2003.

BARREIROS, A.L.; DAVID, J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesas do organismo. **Química Nova**, v.29, n.1, p.113-123, 2006.

BECKMAN, J. A. et al. Ascorbate restores endothelium-dependent vasodilation impaired by acute hyperglycemia in humans. **Circulation**, v. 103, p. 1618-1623, 2001.

BISWAS, H. A. AIDS epidemic worldwide and the millennium development strategies: A light for lives. **HIV & AIDS Review**, v 11, p. 87-94, 2012.

BLAS-GARCIA, A.; APOSTOLOVA, N. ; ESPLUGUES, J. V. Oxidative stress and mitochondrial impairment after treatment with anti-HIV drugs: clinical implications **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, p. 4076-4086, 2011.

BOGER, R. H. Asymmetric Dimethyl arginine, an Endogenous Inhibitor of Nitric Oxide Synthase, Explains the “L-Arginine Paradox” and Acts as a Novel Cardiovascular Risk Factor. **Journal of Nutrition**, v.134, p. 2842S-2847S, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais. **Recomendações para terapia antirretroviral em adultos infectados pelo HIV**. Brasília, DF, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais. **Recomendações para terapia antirretroviral em adultos infectados pelo HIV**. Brasília, DF, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde - Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Boletim Epidemiológico - Aids e DST Ano II - nº 1 - até semana epidemiológica 26ª**. Brasília, DF, 2013a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais. **Manual Técnico Para o Diagnóstico Da Infecção Pelo HIV**. Brasília, DF, 2013b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos do Ministério da Saúde**. Brasília, DF, 2013c.

BRÍGIDO, L. F. et al. HIV type 1 subtype C and CRF01\_AG recombinants prevail at the cities with the highest AIDS prevalence rate in Brazil. **AIDS Research Human Retroviruses**, v. 23, p. 1579-86, 2007.

BRYAN, N. S.; GRISHAM, M. B. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 43, p. 645-657, 2007.

BUSCONI, L.; MICHEL, T. Endothelial nitric oxide synthase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 12, p. 8410-8413, 1993.

CAHN, P. et al. Dual therapy with lopinavir and ritonavir plus lamivudine versus triple therapy with lopinavir and ritonavir plus two nucleoside reverse transcriptase inhibitors in antiretroviral-therapy-naive adults with HIV-1 infection: 48 week results of the randomised, open label, non-inferiority GARDEL trial. **Lancet Infect Dis**, v.14, n. 7, p. 572-580, Jul. 2014. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70736-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70736-4)>. Acesso em: 25marc.2014.

CAMERON, D. W. et al. Randomized placebo-controlled trial of ritonavir in advanced HIV-1 disease. **Lancet**, v. 351, p. 543-549, 1998.

CAPELLINI, V. K. et al. Diabetes and vascular disease: basic concepts of nitric oxide physiology, endothelial dysfunction, oxidative stress and therapeutic possibilities. **Current Vascular Pharmacology**, v. 8, p. 526-544, 2010.

CARAMORI, P. R. A.; ZAGO, A. J. Disfunção endotelial e doença arterial coronariana. **Revista Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 75, p. 163-172, 2000.

CARRASCO, L.; ALMENDRAL DEL RIO, J. M. **Retroviridae**. Madrid: Hélice, 2006.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men-New York City and California. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 30, p. 305-308, 1981.

CHOMONT, N. et al. HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. **Nature Medicine**, v.15, p.893-900, 2009.

CHOOPANYA, K. et al. Antiretroviral prophylaxis for HIV infection in injecting drug users in Bangkok, Thailand (the Bangkok Tenofovir Study): a randomized, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. **Lancet**, v. 381, p. 2083-2090, 2013.

CLAVEL, F. et al. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. **Science**, v. 233, p.343-346, 1986a.

CLAVEL, F. et al. Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. **Nature**, v. 324, p. 691-695, 1986b.

CLAVEL, F. et al. Human immunodeficiency virus type 2 infection associated with AIDS in West Africa. **New England Journal of Medicine**, v. 316, p. 1180-1185, 1987.

COFFIN, J. A. et al. Human immunodeficiency viruses. **Science**, v. 232, p. 697, 1986.

COGGINS, M. P.; BLOCH, K. D. Nitric oxide in the pulmonary vasculature. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 27, p. 1877-1885, 2007.

COHEN, S. M. et al. The Detection of Acute HIV Infection, **The Journal of Infectious Diseases**, v. 330, p. 1551-1557, 2010.

COHEN, M .S. et al. Acute-HIV-1 Infection: Basic, clinical and public health perspectives. **New England Journal of Medicine**, v.364, p. 1943-1954, 2011.

COTRAN, R. S. et al. **Patologia estrutural e funcional**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

CUERDA, C. et al. Antioxidantes y diabetes mellitus: revisión de la evidencia. **Nutricion Hospitalaria**, v. 26, p. 68-78, 2011.



DAAR, E. S. et al. Diagnosis of primary HIV-1 infection. Los Angeles County Primary HIV Infection Recruitment Network. **Annals of Internal Medicine**, v. 134, p. 25-29, 2001.

DANGETI, S. T. Distinct advancements and challenges in HIV 1 vaccine development and cure - A review. **HIV & AIDS Review**, v. 13, p. 1-5, 2014.

DEANFIELD, J. E.; HALCOX, J. P; RABELINK, T. J. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. **Circulation**, v. 115, p. 1285-1295, 2007.

DECIFRANDO A BIOLOGIA. Características dos seres vivos. 2013. Disponível em: <<http://kellybiologia.blogspot.com.br/2013/03/caracteristicas-dos-seres-vivos-aula-5.html>>. Acesso:01mai.2014.

DE CLERCQ, E. HIV-chemotherapy and prophylaxis: new drugs, leads and approaches. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, p. 1800-1822, 2004.

\_\_\_\_\_. Anti-HIV drugs: 25 compounds approved within 25 years after the discovery of HIV. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, p. 307-320, 2008.

\_\_\_\_\_. Antiretroviral drugs. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 10, p. 507-515, 2010.

DEEKS, S. G. et al. Raltegravir. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, p.117-119, 2008.

\_\_\_\_\_. HIV infection, inflammation, immunosenescence, and aging. **Annual Review of Medicine**, v. 62, p. 141-155, 2011.

\_\_\_\_\_.; PHILLIPS, A. N. HIV infection, antiretroviral treatment, ageing, and non-AIDS related morbidity. **British Medical Journal**, v.338, a. 3172, 2009.

\_\_\_\_\_.et al. Towards an HIV cure: a global scientific strategy. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, p.607–614, 2012.

\_\_\_\_\_.; TRACY, R.; DOUEK, D. C. Systemic Effects of Inflammation on Health during Chronic HIV Infection. **Immunity**, v. 39, p. 633-645, 2013.

DELFRAISSY, J. F. et al. Lopinavir/ritonavir monotherapy or plus zidovudine and lamivudine in antiretroviral-naive HIV-infected patients. **AIDS**, v. 22, p. 385-393, 2008.

DOMS, R.W. Unwelcome Guests With Master Keys: How HIV Enters Cells and How It Can Be Stopped. **International AIDS Society-USA, Topics in HIV Medicine**, v. 12, p. 100-103, 2004.

DUSSE, L. M. S. A. et al. Does plasma nitrite determination by the Griess reaction reflect nitric oxide synthesis? **Clinical Chemical Acta**, v. 362, p. 195-197, 2005.

DYER, J. R. Association of CD4 cell depletion and elevated blood and seminal plasma human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA concentrations with genital ulcer disease in HIV-1—infected men in Malawi. **Journal of Infectious Diseases**, v. 177, p. 224-227, 1998.

EMERMAN, M.; MALIM, M. H. HIV-1 regulatory/accessory genes: keys to unraveling viral and host cell biology. **Science**, v. 280, p. 1880-1884, 1998.

FAUCI, A. S. et al. Immunopathogenic Mechanisms in Human Immunodeficiency Virus (HIV) Infection. **NIH CONFERENCE**, v.114, p.678-693,1991.

FERREIRA, W. F.; SOUSA, J. C. **Microbiologia**. 3. ed. Lisboa: Lidel, 2002.

FIEBIG, E. W. et al. Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. **AIDS**, v. 17, p. 1871-1879, 2003.

FORSMAN, A.; WEISS, R. A. Why is HIV a pathogen? **Trends Microbiological**, v. 16, p. 555-560, 2008.

FÖRSTERMANN, U.; MÜNDEL, T. Endothelial Nitric Oxide Synthase in Vascular Disease: From Marvel to Menace. **Circulation**, v. 113, p. 1708-1714, 2006.

FRANCO; S. When to start antiretroviral therapy: as soon as possible. **BMC Medicine**, v.11, p.147, 2013.

FRANKEL, A.; YOUNG, D. J. A. HIV-1: Fifteen proteins and RNA. **Annual Review of Biochemistry**, v. 67, p. 1-25, 1998.

FREED, E. O. HIV-1 replication. **Somatic Cell and Molecular Genetics**, v. 6, p. 13-33, 2002.

FRIIS-MOLLER, N. et al. Class of antiretroviral drugs and the risk of myocardial infarction. **New England Journal of Medicine**, v. 356, p. 1723-1735, 2007.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Disponível em: <http://www.fda.gov/forconsumers/byaudience/forpatientadvocates/hivandaidsactivities/ucm118915.htm>. Acesso em 01 de apr. 2014.

FURCHGOTT, R. F.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. **FASEB Journal**, v. 3, p. 2007-2018, 1989.

GAMBLE, L. J.; MATTHEWS, Q. L. Current progress in the development of a prophylactic vaccine for HIV-1. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 5, p. 9-26, 2010.

GERARD, L.; GALICIER, L.; MAILLARD, A. Systemic non-Hodgkin lymphoma in HIV-infected patients with effective suppression of HIV replication: persistent occurrence but improved survival. **Journal Acquire Immune Deficient Syndrome**, v. 30, p. 478-484, 2000.

GIL, L. et al. Does mitochondrial dysfunction during antiretroviral therapy in human immunodeficiency virus infection suggest antioxidant supplementation as a beneficial option? **Redox Report**, v. 10, p. 113-119, 2005.

GIULIVI, C. Characterization and function of mitochondrial nitric-oxide synthase. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 34, p. 397-408, 2003.

GORRY, P. R.; ANCUTA, P. Coreceptors and HIV-1 pathogenesis. **Current HIV/AIDS Reports**, v. 8, p. 45-53, 2011.

GRANICH, R. et al. Highly active antiretroviral treatment as prevention of HIV transmission: review of scientific evidence and update. **Current Opinion in HIV and AIDS**, v. 5, p. 298-304, 2010.

GRANGEIRO, A. et al.. Late entry into HIV care: estimated impact on AIDS mortality rates in Brazil, 2003–2006. **PLoS ONE**, v. 6, p. e14585, 2011.

GRANT, R. et al. Preexposure chemoprophylaxis for HIV prevention in men who have sex with men. **New England Journal of Medicine**, v. 363, p. 2587-2599, 2010.

GREENE, W. C. A history of AIDS: Looking back to see ahead. **European Journal of Immunology**, v. 37, p. 94-102, 2007.

GRINSPOON, S. K. et al. State of the science conference: initiative to decrease cardiovascular risk and increase quality of care for patients living with HIV/AIDS: executive summary. **Circulation**, v. 118, p. 198-210, 2008.

GROSS, S. S.; WOLIN, M. S. Nitric oxide: pathophysiological mechanism. **Annual Review of Physiology**, v. 57, p. 737-769, 1995.

GUARALDI, G. et al. Premature age-related comorbidities among HIV-infected persons compared with the general population. **Clinical Infectious Disease**, v.53, p. 1120-1126, 2011.

HAFNER, F. et al. Endothelial dysfunction and brachial intima-media thickness: long term cardiovascular risk with claudication related to peripheral arterial disease: a prospective analysis. **PLoS One**, v. 9, p. e93357, 2014.

HALLIWELL, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases. **Drugs & Aging**, v. 18, p. 685-716, 2001.

\_\_\_\_\_; GUTTERIDGE, J. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3. ed. New York: Oxford, 2000.

HAHN, B. H. et al. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. **Science**, v. 287, p. 607–614, 2000.

HLADIK, F.; MCEL RATH, M. J. Setting the stage: Host invasion by HIV. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, p. 447-457, 2008.

HOFFENBERG, S. et al., Identification of an HIV-1 clade an envelope that exhibits broad antigenicity and neutralization sensitivity and elicits anti-bodies targeting 3 distinct epitopes. **Journal of Virology**, v. 87, p. 5372-5383, 2013.

HO, J. E. et al. The Association of CD4+ T-Cell Count on Cardiovascular Risk in Treated HIV Disease. **AIDS**, v. 26, p. 1115-1120, 2012.

HORNAK, V.; SIMMERLING, C. Targeting structural flexibility in HIV-1 Protease inhibitor binding. **Drug Discovery Today**, v. 12, p. 132-138, 2007.

HSICH, E. et al. Vascular effects following homozygous disruption of p47: An essential component of NADPH oxidase. **Circulation**, v. 101, p. 1234-36, 2000.

HSUE, P. Y.; DEEKS, S. G.; HUNT, P. W. Immunologic Basis of Cardiovascular Disease in HIV-Infected Adults. **Journal infectious Diseases**, v. 205, p. 375-376, 2012.

HUNG, C. C.; CHANG, S. C. Impact of highly active antiretroviral therapy on incidence and management of human immunodeficiency virus-related opportunistic infections. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v.54, p. 849-853, 2004.

JAMESON, J. L. **Principles of Molecular Medicine**. New Jersey: Humana Press Inc., 1998.

JANG, J. J. et al. Asymmetric dimethylarginine and coronary artery calcium scores are increased in patients infected with human immunodeficiency virus. **Atherosclerosis**, v. 217, p. 514- 517, 2011.

JARDINE, J. et al. Rational HIV immunogen design to target specific germ line B cell receptors. **Science**, v. 340, p. 711-716, 2013.

JOINT UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS.. AIDS Info. Disponível em: <<http://www.unaids.org/en/data analysis/data tools/aids info/>>. Acesso em: 01 jun. 2014.

JOINT UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS. AIDS epidemic update, 2008. Disponível em: <[www.unaids.org](http://www.unaids.org)>. Acesso em: 18 jan. 2013.

JOHNSTONE, M. T. et al. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. **Circulation**, v. 88, p. 2510-2516, 1993.

KATLAMA, C., MURPHY, R. Emerging role of integrase inhibitors in the management of treatment-experienced patients with HIV infection. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 5, p. 331-340, 2009.

KLINE, E. R. et al. Vascular oxidative stress and nitric oxide depletion in HIV-1 transgenic rats are reversed by glutathione restoration. **American Journal of Physiology**, v. 294, p. H2792–H2804, 2008.

KLINGER, Y.; SHAI, Y. A leucine zipper-like sequence from the cytoplasmic tail of the HIV-1 envelope glycoprotein binds and perturbs lipid bilayers. **Biochemistry**, v. 36, p. 5157-5169, 1997.

KOHL, N. E. et al. Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, p.4686-4690, 1988.

KOZAL, M. J. et al. A nucleoside- and ritonavir-sparing regimen containing atazanavir plus raltegravir in antiretroviral treatment-naïve HIV-infected patients: SPARTAN study results. **HIV Clinical Trials**, v. 13, p. 119-130, 2012.

KURITZKES, D.; KAR, S.; KIRKPATRICK, P. Maraviroc. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, p. 15-17, 2008.

LABONTE, J.; LEBBOS, J.; KIRKPATRICK, P. Enfuvirtide. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, p. 345-347, 2003.

LEHNINGER, A. L. Princípios de Bioquímica. São Paulo, Sarvier, p 33-34, 2002.

LENJISA, J. L.; WOLDU, M. A.; SATESSA, G. D. New hope for eradication of HIV from the body: the role of polymeric nanomedicines in HIV/AIDS pharmacotherapy. **Journal of Nanobiotechnology**, v.12, p.9, 2014.

LIU, Y. et al. Novel Approach to Block HIV-1 Coreceptor CXCR4 in Non-toxic Manner. **Molecular Biotechnology**, v 2014.

LOOKING FOR DIAGNOSIS. Disponível em:  
[http://img1.wikia.nocookie.net/\\_\\_cb20131004045826/aia1317/pt-br/images/3/3b/Ciclo.jpg](http://img1.wikia.nocookie.net/__cb20131004045826/aia1317/pt-br/images/3/3b/Ciclo.jpg).  
 Acesso em 20 jun. 2014.

MACCARTHY, S. et al. Late presentation to HIV/AIDS testing, treatment or continued care: clarifying the use of CD4 evaluation in the consensus definition. **HIV Medicine**, v. 15, p. 130-134, 2014.

MANDAS, A. et al. Oxidative Imbalance in HIV-1 Infected Patients Treated with Antiretroviral Therapy. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, Article ID 749575, 2009.

MARLINK, R. et al. Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1. **Science**, v. 265, p. 1587-1590, 1994.

MASIA, M. et al. Endothelial function in HIV-infected patients switching from a boosted protease inhibitor-based regimen to raltegravir: a sub study of the SPIRAL study. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, p. 409-413, 2013.

MELIKIAN, N. et al. Neuronal nitric oxide synthase and human vascular regulation. **Trends Cardiovascular Medicine**, v. 19, p. 256-262, 2009.

MENENDEZ-ARIAS, L. Molecular basis of human immunodeficiency virus drug resistance: An update. **Antiviral Research**, v. 85, p. 210-231, 2009.

MICHEL, T.; FERON, O. Nitric oxide synthases: Which, where, how and why? **Journal of Clinical Investigation**, v. 100, p. 2146-2152, 1997.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. The L-Arginine nitric oxide pathway. **The New England Journal of Medicine**, v. 27, p. 2002-2012, 1993.

MONDAL, D. et al. Nelfinavir Suppresses Insulin Signaling and Nitric Oxide Production by Human Aortic Endothelial Cells: Protective Effects of Thiazolidinediones. **The Ochsner Journal**, v. 13, p. 76-90, 2013.

MONNO, L., L. SCUDELLER, G. BRINDICCI, A. et al. Genotypic analysis of the protease and reverse transcriptase of non-B HIV type 1 clinical isolates from naive and treated subjects. **Antiviral Research**, v. 83, p.118-126, 2009.

MONTANER, J.S. Treatment as Prevention: Toward an AIDS-Free Generation. **Topics in Antiviral Medicine**, v. 21, p. 110-114, 2013.

MOLLACE, V.; SALVEMINI, D.; RILEY, D.P. The contribution of oxidative stress in apoptosis of human cultured astroglial cells induced by supernatants of HIV-1-infected macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 71, p. 65-72, 2002.

MOSHAGE, H. et al. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 41, n. 6, p. 892-896, 1995.

NAPOLI, C. et al. Nitric oxide and atherosclerosis: an update. **Nitric Oxide**, v. 15, n. 4, p. 265-79, 2006.

\_\_\_\_\_; IGNARRO, L. J. Nitric oxide and pathogenic mechanisms involved in the development of vascular diseases. **Archives of Pharmacal Research**, v. 32, n. 8, p. 1103-1108, 2009.

NATIONAL INSTITUTE OF ALLERGY AND INFECTIOUS DISEASES. Types of HIV/AIDS antiretroviral drugs. 2013. Disponível em: <<http://www.niaid.nih.gov/topics/hivaids/understanding/treatment/Pages/arvDrugClasses.aspx>>. Acesso em: 25 mai.2014.

NDUNG'U, T.; WEISS, R. A. On HIV diversity. **AIDS**, v. 26, p. 1255-60, 2012.

NEDIANI, C. et al. Nitric oxide/reactive oxygen species generation and nitroso/redox imbalance in heart failure: from molecular mechanism to therapeutic implication. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, p. 289-331, 2011.

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

NOTTET, H. S.; GENDELMAN, H. E. Unraveling the neuroimmune mechanisms for the HIV-1-associated cognitive/motor complex. **Immunology today**, v. 16, p. 441-448, 1996.

NUNES, C. C. et al. The influence of HIV-1 subtypes C, CRF31\_BC and B on disease progression and initial virologic response to HAART in a Southern Brazilian cohort. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, p. 205-11, 2014.

OSMANOV, S. et al. Network for HIV Isolation and Characterization, estimated global distribution and regional spread of HIV-1 genetic subtypes in the year 2000. **Journal Acquire Immune Deficient Syndrome**, v. 29, p. 184-190, 2002.

OVERBAUGH, J.; BANGHAM, C. R. M. Selection forces and constraints on retroviral sequence variation. **Science**, v. 292, p. 1106-1109, 2001.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiological Reviews**, v. 87, p. 315-324, 2007.

PALM, J. et al. Nasal nitric oxide is reduced in patients with HIV. **Acta Otolaryngol**, v. 120, p. 420-423, 2000.

PEDERSEN, C. et al. Clinical course of primary HIV infection: consequences for subsequent course of infection. **British Medical Journal**, v. 299, p. 154, 1989.

PERE, D. et al. Dyslipidemia and Cardiovascular Disease Risk Factor Management in HIV-1-Infected Subjects Treated with HAART in the Spanish VACH Cohort. **Open AIDS Journal**, v. 2, p. 26-38, 2008.

PEETERS, M.; AGHOKENG, A.F.; DELAPORTE, E. Genetic diversity among human immunodeficiency virus-1 non-B subtypes in viral load and drug resistance assays. **Clinical Microbiology and Infection**, v.16, p. 1525-1531, 2010.

QUEIROZ, A. T. L. et al. Re-mapping the molecular features of the human immunodeficiency virus type 1 and human T-cell lymphotropic virus type 1 Brazilian sequences using a bioinformatics unit established in Salvador, Bahia, Brazil, to give support to the viral epidemiology studies. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 133-139, 2007.

QUINONES-MATEU, M. E. et al. Viral drug resistance and fitness. **Advances in Pharmacology**, v. 56, p. 257-296, 2008.

RABOUD, J. M. et al. Impact of adherence on duration of virological suppression among patients receiving combination antiretroviral therapy. **HIV Medicine**, v.3, p.118–124, 2002.

RACHID, M.; SCHECHTER, M. **Manual HIV/AIDS**. 9. ed. São Paulo: Revinter, 2008.

RAFFANTI, S.; HAAS, D. W. Agentes Anti-Retrovirais. In: BRUNTON, L. L. (Ed.). **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2006. p. 1671.

REQUEJO, H. Worldwide molecular epidemiology of HIV. **Revista de Saúde Pública**, v. 40, p. 331-45, 2006.

RIDDLER S.A. et al. Class-sparing regimens for initial treatment of HIV-1 infection. **New England Journal of Medicine**, v. 358, p. 2095-106, 2008.

ROBERTS, C. K.; SINDHU, K. K. Oxidative stress and metabolic syndrome. **Life Sciences**, v. 84, p. 705-712, 2009.

ROBERT, L. S.; MICHAEL, F.; DOLAN, V. F. Trends in Mortality of Insurance Applicants with HIV Infection. **Journal of Insurance Medicine**, v. 43, p. 67-75, 2012.

RODGER, A. et al. HIV transmission risk through condomless sex if HIV+ partner on suppressive ART: PARTNER study. In: **CONFERENCE ON RETROVIRUSES AND OPPORTUNISTIC INFECTIONS**, Boston, 2014.

ROMITELLI, F. et al. Comparison of nitrite/nitrate concentration in human plasma and serum samples measured by the enzymatic batch Griess assay, ion-pairing HPLC and ion-trap GC-MS: the importance of a correct removal of proteins in the Griess assay. **Journal of Chromatography**, v. 851, p. 257-267, 2007.

SABIN, C. A. Do people with HIV infection have a normal life expectancy in the era of combination antiretroviral therapy? **BMC Medicine**, v.11, p.251, 2013.

SANTOS, C. Q.; COELHO-MARTINS, S.; AZEVEDO P. J. The Prestige! Differences between HIV and SIV: virus-cell initial interaction-tropism and pathogenicity. In: **CONGRESSO VIRTUAL: NOVAS PERSPECTIVAS SOBRE A INFECÇÃO VIH/SIDA E DOENÇAS**, 2007.

SHANKAR, S. S.; DUBE, M. P. Clinical aspects of endothelial dysfunction associated with human immunodeficiency virus infection and antiretroviral agents. **Cardiovascular Toxicology**, v. 4, p. 261-269, 2004.

SHARP, P. M.; HANN, H. H. Origins of HIV and the AIDS. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 1, a. 006841, 2011.

SIERRA, S.; KUPFER, B.; KAISER, R. Basics of the virology of HIV-1 and its replication. **Journal Clinical of Virology**, v. 34, p. 233-244, 2005.

SIMON, D. et al. Subtipos do HIV-1 no sul do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, 2006.

SLUIS-CREMER, N.; TEMIN, N. A.; BAHAR, I. Conformational changes in HIV-1 reverse transcriptase induced by nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor binding. **Current HIV Research**, v. 2, p. 323-332, 2004.

SMITH, R. L. et al. Premature an accelerated aging: HIV or HAART? **Frontiers in Genetics**, v. 3, p. 328, 2013.

SORIANO, V. et al. **Resistencias a los antirretrovirales**. Barcelona: Publicaciones Permanyer, 2005.

STONER, L. et al. There's more to flow-mediated dilation than nitric oxide. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 19,p. 589–600, 2012.

STUEHR, D.; POU, S.; ROSEN, G. M. Oxygen reduction by nitric-oxide synthases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 14533-14536, 2001.

SWANSON, C. M.; MALIM, M. H. Snapshot: HIV-1 proteins. **Cell**, v. 133, p. 742, 2008.

SZABO, C.; LIAUDET, L.; SORIANO, F. G. Biology of nitric oxide signaling. **Journal of Critical Care**, v. 28, p. 37-52, 2000.

TANG, M. W.; SCHAFFER, R. HIV-1 Antiretroviral Resistance Scientific, Principles and Clinical Applications. **Drugs**, v. 72, p. e25, 2012.



TATSCH, E. et al. A simple and inexpensive automated technique for measurement of serum nitrite/nitrate. **Clinical Biochemistry**, v. 44, p. 348-350, 2011.

TODA, N.; IMAMURA, T.; OKAMURA, T. Alteration of nitric oxide-mediated blood flow regulation in diabetes mellitus. **Pharmacology Therapy**, v. 127, p. 189-209, 2010.

TORRE, D.; PUGLIESE, A.; SPERANZA, F. Pathogenic mechanisms of mitochondrial DNA depletion in patients with HIV-1 infection. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, p. 273-280, 2002.

THIGPEN, M. C. et al. Antiretroviral preexposure prophylaxis for heterosexual HIV transmission in Botswana. **New England Journal of Medicine**, v. 367, p. 423-434, 2012.

VALLARI, A. et al. Confirmation of putative HIV-1 group P in Cameroon. **Journal of Virology**, v. 85, p. 1403–1407, 2011.

VAN BRAECKEL, E. et al., Polyfunctional CD4+T cell responses in HIV-1-infected viral controllers compared with those in healthy recipients of an adjuvanted polyprotein HIV-1 vaccine. **Vaccine Journal**, v. 31, p. 3739-3746, 2013.

VANHOUTTE, P. M. Vascular biology: old-timer makes a comeback. **Nature**, v. 396, p. 213-216, 1998.

VAN HEUVERSWYN, F. et al. Human immunodeficiency viruses: SIV infection in wild gorillas. **Nature**, v. 444, p. 164, 2006.

VAN LINT, C.; BOUCHAT, S.; MARCELLO, A. HIV-1 transcription and latency: an update **Retrovirology**, v.10, p.67, 2013.

VASCONCELOS, S. M. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, p. 1323-1338, 2007.

WADA, N. et al. Cause-Specific life expectancies after 35 years of age for human immunodeficiency syndrome-infected and human immunodeficiency syndrome-negative individuals followed simultaneously in long-term cohort studies, 1984–2008. **American Journal of Epidemiology**, v. 177, p. 116-125, 2013.

WATERS, L.; SABIN, C. A. Late HIV presentation: epidemiology, clinical implications and management. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 9, p. 877-889, 2011.

WATTANAPITAYAKUL, S. K.; BAUER, J. A. Oxidative pathways in cardiovascular disease: roles, mechanisms, and therapeutic implications. **Pharmacological Therapy**, v. 89, p. 187-206, 2001.

WYATT, C. M. et al. Chronic kidney disease in HIV infection: an urban epidemic. **AIDS**, v. 21, p. 2101-2103, 2007.

YAMAGUCHI, Y. et al. Elevated circulating levels of markers of oxidative-nitrative stress and inflammation in a genetic rat model of metabolic syndrome. **Nitric Oxide**, v. 15, p. 380-386, 2006.

ZAGO, A. S.; ZANESCO, A. Óxido Nítrico, Doenças Cardiovasculares e Exercício Físico. **Revista Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 87, p. 264-270, 2006.

HOU, L.; ZHU, D. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. **Nitric oxide**, v. 20, p. 223-230, 2009.

## ANEXOS

### Anexo A - Carta de aprovação do protocolo de pesquisa.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA MARIA/ PRÓ-REITORIA  
DE PÓS-GRADUAÇÃO E



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação de biomarcadores em pacientes HIV positivos antes e durante a terapia anti-retroviral.

**Pesquisador:** José Edson Paz da Silva

**Área Temática:**

**Versão:** 5

**CAAE:** 14741113.1.0000.5346

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

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 360.541

**Data da Relatoria:** 06/08/2013

##### Apresentação do Projeto:

Dissertação de mestrado que caracteriza-se como um estudo transversal prospectivo, em que serão colhidas amostras de sangue venoso dos pacientes por meio da técnica padrão de punção venosa. A determinação dos parâmetros hematológicos será realizada no laboratório de Bioquímica Clínica e Toxicológica do Departamento de Análises Clínicas da UFSM, com o soro restante, após terem sido realizadas as dosagens bioquímicas de rotina nos pacientes. Nenhuma colheita de sangue será realizada exclusivamente para o estudo proposto. Os resultados obtidos serão analisados estatisticamente através da análise da variância (ANOVA) seguida de pós-teste de Tukey. Também será empregado o teste de correlação de Pearson para investigar o grau de correlação entre os parâmetros avaliados, sendo  $P < 0,05$  considerado estatisticamente significativo.

##### Objetivo da Pesquisa:

**Objetivo Primário:**

- Avaliar os níveis de marcadores associados a processo inflamatório, isquêmico e estresse oxidativo em pacientes HIV positivos e estabelecer a associação destes marcadores com a carga viral, contagem de linfócitos TCD4+ e com o tempo de tratamento antiretroviral.

**Endereço:** Av. Roraima, 1000 - Prédio da Reitoria 2º andar  
**Bairro:** Cidade Universitária - Camobi **CEP:** 97.105-000  
**UF:** RS **Município:** SANTA MARIA  
**Telefone:** (55)3220-9362

**E-mail:** cep.ufsm@gmail.com

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA MARIA/ PRÓ-REITORIA  
DE PÓS-GRADUAÇÃO E



Continuação do Parecer: 300.541

**Objetivo Secundário:**

- Verificar os níveis de IMA e AOPP em pacientes HIV positivos com e sem tratamento antiretroviral.
- Investigar a relação dos níveis de IMA com o tempo de HAART.
- Avaliar o papel da IMA como marcador precoce de efeitos colaterais dos ARV.
- Estudar a correlação entre carga viral e contagem de linfócitos TCD4/CD8 e níveis de IMA.
- Correlacionar os níveis de AOPP com o tempo de HAART.
- Verificar a relação dos níveis de AOPP com a carga viral e a contagem de linfócitos TCD4+
- Verificar os níveis de glicose, colesterol total, LDL, HDL, triglicerídeos e albumina e sua relação com os níveis de IMA e AOPP em pacientes com e sem tratamento ARV.
- Estudar a variação dos parâmetros hematológicos: WBC, HT, Hb,PLA e VPM em pacientes com e sem tratamento ARV.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Estão corretamente descritos tanto no corpo do projeto como no TCLE.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa de relevância científica, irá investigar 100 pacientes com HIV positivo, sendo metade em uso de TARV e 50 sem TARV, apresenta critérios de inclusão, critérios de exclusão, orçamento e cronograma adequados.

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

Encontram-se adequados todos os termos de apresentação obrigatória.

**Recomendações:**

Não há.

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

Foram atendidas todas as pendências.

**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: Cidade Universitária - Camobi CEP: 97.105-900  
 UF: RS Município: SANTA MARIA  
 Telefone: (55)3220-9362 E-mail: cep.ufsm@gmail.com

Página 02 de 03

SANTA MARIA, 14 de Agosto de 2013

Assinador por:  
 Félix Alexandre Antunes Soares  
 (Coordenador)

**Anexo B - Comprovante de submissão do artigo científico.**

HIV Medicine



**Evaluation of nitric oxide in HIV infection and the influence of antiretroviral therapy on serum levels of nitric oxide metabolites**

Journal:	<i>HIV Medicine</i>
Manuscript ID:	HIV-OA-06-2014-2679
Manuscript Type:	Original research
Date Submitted by the Author:	10-Jun-2014
Complete List of Authors:	Soccal, Renata; Federal University of Santa Maria, De Carvalho, José; Federal University of Santa Maria, Bochi, Guilherme; Federal University of Santa Maria, Moresco, Rafael; Federal University of Santa Maria, Da Silva, José Edson; Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
Keywords:	HIV, nitric oxide, endothelium, cardiovascular disease

SCHOLARONE™  
Manuscripts

Review