

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DANIELLE CRISTYANE KALVA BORATO

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS LABORATORIAIS, PROTEÍNA C REATIVA E
MIELOPEROXIDASE EM INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO VÍRUS DA
IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA**

PONTA GROSSA
2011

DANIELLE CRISTYANE KALVA BORATO

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS LABORATORIAIS, PROTEÍNA C REATIVA E
MIELOPEROXIDASE EM INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO VÍRUS DA
IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
mestre na Universidade Estadual de Ponta Grossa,
Área de Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Rebuglio Velloso

Co-orientador: Prof. Dr. Emerson Carraro

PONTA GROSSA
2011

Ficha Catalográfica Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

B726a

Borato, Danielle Cristyane Kalva

Avaliação de parâmetros laboratoriais, Proteína C Reativa e Mieloperoxidase em indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana / Danielle Cristyane Kalva Borato. Ponta Grossa, 2011.

43 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual de Ponta Grossa .

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Rebuglio Velloso

Co-orientador : Prof. Dr. Emerson Carraro

1. Risco cardíaco. 2. HIV. 3. Mieloperoxidase. I. Velloso, José Carlos Rebuglio. II. Carraro, Emerson. III.T.

CDD: 616.979.2

DANIELLE CRISTYANE KALVA BORATO

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS LABORATORIAIS, PROTEÍNA C REATIVA E
MIELOPEROXIDASE EM INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO VÍRUS DA
IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA**

Dissertação apresentada para obtenção de título de mestre na Universidade Estadual de Ponta Grossa, Área de Ciências Farmacêuticas.

Ponta Grossa, 17 de junho de 2011.

Prof. Dr. José Carlos Rebuglio Velloso – Orientador
Doutorado em Análises Clínicas - Bioquímica
Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG

Profa. Dra. Célia Cristina Leme Beu
Doutorado em Biologia Celular e Estrutural
Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE

Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil
Doutorado em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia
Universidade Estadual do Centro-Oeste - UNICENTRO

RESUMO

A doença cardiovascular aterosclerótica tem se tornado uma importante causa de morbidade e mortalidade entre indivíduos com o vírus da imunodeficiência humana (HIV). Atualmente, a maioria destes pacientes tem acesso aos medicamentos antiretrovirais, o que diminuiu o risco para a AIDS e elevou a expectativa de vida. Sendo assim, torna-se necessária uma melhor monitorização dos fatores de risco cardiovasculares tradicionais, cujas alterações são muitas vezes mais comuns em indivíduos com infecção pelo HIV. Considera-se importante a avaliação laboratorial em pacientes infectados pelo HIV, com ou sem desenvolvimento da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS) e o estabelecimento de políticas preventivas em saúde, por meio do monitoramento da morbimortalidade e seus fatores de risco. Há, portanto, a necessidade em se definir novas tendências no monitoramento laboratorial em pacientes infectados pelo HIV, tal como a avaliação percentual de células T CD4+ no monitoramento imunológico e indicadores bioquímicos sensíveis e precoces para o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, no sentido de se diagnosticar condições de risco de morte do indivíduo, elevando assim a chance de sucesso dos tratamentos necessários. Atualmente, observa-se o interesse crescente na mieloperoxidase (MPO; 1.11.1.7) como marcador do risco cardíaco, devido à possibilidade desta se apresentar com níveis séricos elevados precocemente em relação às biomoléculas utilizadas atualmente para tal fim, como a proteína C reativa ultrasensível (PCR-us). O presente trabalho teve por objetivo avaliar os níveis de MPO sérica em indivíduos infectados pelo HIV, como possível biomarcador para indicação precoce de risco cardíaco, em conjunto com diferentes exames laboratoriais para avaliação e o monitoramento imunológico destes pacientes. Os resultados obtidos indicaram, dentre outros, diferenças nos valores percentuais de linfócitos T Cd4+ obtidos por diferentes metodologias, o que poderia causar conflito nas decisões clínicas relacionadas ao tratamento e à assistência de pessoas infectadas pelo HIV. Além disso, observaram-se diferenças significativas nos valores de proteína C reativa ultrasensível (PCR-us) e da mieloperoxidase sérica, sugerindo o uso como elemento laboratorial com valor preditivo de eventos cardiovasculares nos pacientes infectados pelo HIV.

Palavras-chave: risco cardíaco; HIV; mieloperoxidase

ABSTRACT

Atherosclerotic cardiovascular disease has become an important cause of morbidity and mortality among individuals with human immunodeficiency virus (HIV). Currently, most of these patients have access to antiretroviral drugs, which has decreasing the risk for AIDS and increasing life expectancy. Therefore, it is necessary a better monitoring of traditional cardiovascular risk factors, whose changes are often more common in individuals with HIV infection. It is considered important the laboratorial evaluation in patients infected with HIV, with or without development of Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) and the establishment of preventive health policies, through the monitoring of mortality and its risk factors. So, there is the necessity to set new trends in laboratory monitoring in patients infected with HIV, such as percentage of CD4+ T cells and early and sensitive biochemical indicators for the risk of developing cardiovascular disease, in order to diagnose life-threatening conditions of the individual, thus increasing the chance of success of treatments needed. Currently, there is growing interest in myeloperoxidase (MPO; 1.11.1.7) as a marker of cardiac risk because of the possibility of performing with high serum levels occurring in the biomolecules that are currently used for this purpose, such as ultra-sensitive C-reactive protein (hs-CRP). This study aimed to assess the levels of MPO levels in HIV-infected individuals, as a possible biomarker for early indication of cardiac risk, together with different laboratory tests for immune monitoring and evaluation of these patients. The results indicated, among others, differences in the percentages of CD4 + T lymphocytes obtained by different methodologies, which could cause conflict in clinical decisions related to treatment and care of people infected with HIV. In addition, there were significant differences in the values of ultrasensitive C-reactive protein (hs-CRP) and serum myeloperoxidase, suggesting their application as laboratory markers with predictive value for cardiovascular events in HIV-infected patients.

Key words: cardiac risk; HIV; myeloperoxidase

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO.....	6
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
2 OBJETIVOS.....	9
2.1 Objetivo geral.....	9
2.2 Objetivos específicos.....	9
3 MATERIAIS E MÉTODO.....	10
3.1 Primeiro Artigo.....	10
3.2 Segundo Artigo.....	11
REFERÊNCIAS.....	11
CAPÍTULO 2 – PRIMEIRO ARTIGO.....	13
Avaliação dos valores percentuais de linfócitos T Cd4+ obtidos estritamente por citometria de fluxo e estimados pelo contador hematológico no monitoramento imunológico de pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV).....	14
CAPÍTULO 3 – SEGUNDO ARTIGO.....	26
Avaliação de parâmetros laboratoriais, proteína C reativa e mieloperoxidase em indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana.....	27
CAPÍTULO 4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	40
ANEXO - PARECER COEP UEPG.....	42

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) é caracterizada por uma inflamação crônica persistente que está associada com deterioração progressiva do sistema imunológico, tendo como principal consequência o aparecimento de doenças oportunistas (SURESH et al., 2009), a evolução para AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Humana) e óbito por complicações associadas a esta infecção (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

Tal condição afeta principalmente os linfócitos T que expressam receptores CD4 (T CD4+), sendo que a entrada do vírus nas células do hospedeiro requer sua ligação a dois receptores de quimiocinas, conhecidos como co-receptores do HIV (CXCR4 e CCR5). Nessa fase inicial, duas glicoproteínas do envelope do HIV, gp120 e gp41, que juntas formam a gp160, são fundamentais para o processo infeccioso por sua atuação na ligação e entrada do conteúdo viral na célula hospedeira (KALIL et al., 2005). A progressão de infecção resulta em depleção progressiva dessas células imunes (linfócitos T CD4+), o que diminui a habilidade do organismo para combater as doenças oportunistas.

Neste contexto, a quantidade de linfócitos T CD4+ desempenha um papel fundamental na patogênese do HIV e, desta forma, a sua contagem é um dos parâmetros imunológicos mais importantes utilizados no acompanhamento dos pacientes infectados pelo vírus (CDC, 1997; O'GORMAN; NICHOLSON, 2000). Por conseguinte, esta contagem é essencial para: i) a avaliação do estado de deficiência imunológica, ii) a determinação do prognóstico, iii) o estabelecimento do diagnóstico de AIDS (CDC, 1997), iv) determinar a necessidade do início da terapia antiretroviral, v) monitorar a eficácia do tratamento e vi) avaliar a necessidade de iniciar ou interromper a profilaxia contra infecções oportunistas, tais como pelo *Pneumocystis carinii* (LI et al., 2009).

A partir de 1996, com a introdução da terapia antiretroviral de alta potência (TARV), observou-se uma acentuada atenuação da deficiência imunológica e, conseqüentemente, uma diminuição da morbidade e mortalidade em indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (PALELLA et al., 1998). A TARV dispõe de uma potente combinação de medicamentos, sendo as principais classes utilizadas: os inibidores da protease (IPs), os inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (ITRNs) e os inibidores da transcriptase reversa não-análogos de nucleosídeos (ITRNNs) (THOMPSON et al., 2010).

Entretanto, associado ao aumento da sobrevivência destes pacientes tem se observado uma série de anormalidades metabólicas e antropométricas, incluindo dislipidemia e resistência à insulina, assim como a perda de gordura subcutânea e obesidade abdominal, que

pode contribuir para o risco cardiovascular precoce em portadores do vírus HIV (ANNURAD et al., 2009).

A infecção pelo HIV induz a um estado de inflamação crônica que pode resultar em disfunção endotelial e contribuir para o risco cardiovascular precoce em portadores do vírus (EL-BEJANI et al., 2008). Além disso, as alterações metabólicas secundárias ao tratamento com TARV também têm sido associadas ao aumento de risco cardiovascular (ANNURAD et al., 2009), sendo caracterizada por lipodistrofia, resistência à insulina e dislipidemia mista, principalmente pelo uso dos IPs, com elevações acentuadas de triglicérides e de LDL-Colesterol, além da redução de HDL-Colesterol (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2007). Desta forma, vários estudos têm demonstrado que a patogênese de doenças cardiovasculares em pacientes portadores do HIV está relacionada tanto com os fatores da própria infecção quanto com o tratamento pela TARV (FRIIS-MOLLER et al., 2003; BAKER; LUNDGRE, 2011; CALZA et al., 2011; CAPILI et al., 2011).

Neste sentido, como os sintomas cardiovasculares podem evoluir durante um longo período de tempo, a sua detecção precoce seria de grande relevância para o diagnóstico da doença cardiovascular (ROSS, 1999). Por isso, um dos cuidados relacionados à infecção pelo HIV inclui o diagnóstico cardiovascular preventivo por meio do monitoramento da rotina laboratorial (CHU; SELWYN, 2011). Portanto, a avaliação de biomarcadores precoces apresenta especial significado para caracterizar o risco cardiovascular nos pacientes portadores do vírus HIV e, dentre esses, o mais consagrado na prática clínica é a proteína C reativa ultra-sensível (PCR-us) (MASIA et al., 2007).

A proteína C reativa (PCR) é um marcador inflamatório que desempenha um papel central na doença cardiovascular (WEBER; HAMM, 2008). É uma proteína de fase aguda, sintetizada pelo fígado e regulada por citocinas, predominantemente a interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e do fator de necrose tumoral- α (TNF- α). Seus níveis estão aumentados em resposta às infecções ativas ou ao processo inflamatório agudo. Elevações modestas dos níveis de PCR estão também presentes em situações crônicas inflamatórias, como a aterosclerose, e seus níveis aproximadamente triplicam na presença de risco de doenças vasculares periféricas (VOLP et al., 2008).

A enzima mieloperoxidase (MPO; 1.11.1.7) tem sido, há algum tempo, sugerida como um dos novos parâmetros para avaliação precoce de doenças cardiovasculares (NICHOLLS; HAZEN, 2004). A mieloperoxidase é uma heme-proteína produzida por neutrófilos e monócitos. Esta enzima é liberada pela ativação e degranulação de leucócitos

polimorfonucleares na microcirculação coronariana nas síndromes coronarianas agudas. Na aterosclerose, a MPO está envolvida na oxidação da fração lipoprotéica de baixa densidade do colesterol (LDL-colesterol) e na ativação de metaloproteinases, participando da instabilização e da ruptura da placa, interferindo na biodisponibilidade do óxido nítrico derivado do endotélio, alterando, assim, o tônus vasomotor e propriedades antiinflamatórias (NICHOLLS; HAZEN, 2009; LORIA et al., 2008). Alguns estudos apontam para o efeito independente dos níveis de MPO, em relação a outros biomarcadores, na evolução da doença cardiovascular e também para o acompanhamento da evolução do quadro clínico de pacientes atendidos em hospitais ao relatarem dor torácica (BRENNAN et al., 2003; MORROW et al., 2008).

A doença cardiovascular aterosclerótica tem se tornado uma importante causa de morbidade e mortalidade entre indivíduos com o vírus da imunodeficiência humana (HIV). Atualmente, a maioria destes pacientes tem acesso aos medicamentos antiretrovirais, o que diminuiu o risco para a AIDS e elevou a expectativa de vida. Sendo assim, torna-se necessária uma melhor monitorização dos fatores de risco cardiovasculares tradicionais, cujas alterações são muitas vezes mais comuns em indivíduos com infecção pelo HIV.

Deste modo, as estratégias de prevenção continuam a ser importantes para estes pacientes e, neste contexto, foi dado início a esta pesquisa, com o objetivo de avaliar os níveis de MPO sérica em indivíduos infectados pelo vírus HIV, como possível biomarcador para indicação precoce de risco cardíaco, em conjunto com diferentes exames laboratoriais para avaliação e o monitoramento imunológico destes pacientes.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a utilização da mieloperoxidase como um potencial biomarcador na rotina laboratorial e novas tendências no monitoramento laboratorial em pacientes infectados pelo HIV, tal como a avaliação percentual de células T CD4+ no monitoramento imunológico.

2.2 Objetivos específicos

São objetivos específicos deste trabalho:

- Identificar o perfil imunológico dos pacientes portadores do HIV;
- Analisar os valores percentuais de linfócitos T CD4+ em pacientes portadores do HIV por diferentes metodologias;

- Determinar os níveis séricos de MPO e outros parâmetros laboratoriais em pacientes infectados pelo HIV (tratados e não-tratados com antiretrovirais) e em indivíduos hígidos;
- Verificar a associação da MPO e outros parâmetros laboratoriais entre os grupos em estudo;
- Correlacionar os níveis séricos de MPO com os dados laboratoriais obtidos.

3 MATERIAIS E MÉTODO

Foram selecionados para o estudo, indivíduos portadores do HIV, atendidos no Centro de Testagem e Aconselhamento/Serviço de Assistência Especializada do Município de Ponta Grossa (CTA/SAE), e os indivíduos não infectados pelo HIV, do Laboratório Universitário de Análises Clínicas (LUAC) da Universidade Estadual de Ponta Grossa, como voluntários da pesquisa. Todos os participantes receberam esclarecimentos sobre a pesquisa, assinaram e dataram o termo de consentimento livre e esclarecido. O protocolo do estudo (N. 0443710) foi aprovado na Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Ponta Grossa, conforme parecer 21/2010 em anexo.

Os materiais e métodos utilizados nesta pesquisa, bem como os resultados obtidos, são descritos nos artigos originados a partir deste trabalho. A dissertação é apresentada na forma destes artigos nos capítulos 1 e 2, de acordo com as opções de formato apresentadas pelo regulamento do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

3.1 Primeiro Artigo: *Avaliação dos valores percentuais de linfócitos T Cd4+ obtidos estritamente por citometria de fluxo e estimados pelo contador hematológico no monitoramento imunológico de pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV)*

Este artigo demonstra a preocupação com a utilização da contagem percentual de células T CD4+ para avaliar a progressão da doença, ao invés da tradicional contagem absoluta de células T CD4+, pois a variação dos resultados obtidos por diferentes metodologias utilizadas poderia ter influência sobre as decisões clínicas relacionadas ao tratamento e à assistência de pessoas infectadas pelo HIV.

3.2 Segundo Artigo: *Avaliação de parâmetros laboratoriais, proteína C reativa e mieloperoxidase em indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV)*

O segundo artigo demonstra alterações laboratoriais importantes em indivíduos infectados pelo HIV, em tratamento ou não, tais como glicose de jejum, lipídios e proteína C reativa. Neste mesmo artigo, também é apresentada a avaliação da mieloperoxidase (MPO) em pacientes infectados pelo HIV como um potencial biomarcador na rotina laboratorial.

REFERÊNCIAS

- (1997). Revised guidelines for performing CD4+ T-cell determinations in persons infected with human immunodeficiency virus (HIV). Centers for Disease Control and Prevention. **MMWR Recomm Rep** 46(RR-2): 1-29, 1997.
- ANNURAD, E., et al. Human immunodeficiency virus and highly active antiretroviral therapy-associated metabolic disorders and risk factors for cardiovascular disease. **Metab Syndr Relat Disord** 7(5): 401-410, 2009.
- BAKER, J. V.; LUNDGREN, J. D. Cardiovascular implications from untreated human immunodeficiency virus infection. **Eur Heart J** 32(8): 945-951, 2011.
- BRASIL. Recomendações para Terapia Antiretroviral em Adultos infectados pelo HIV. Ministério da Saúde. **Programa Nacional de DST e AIDS** 2008;7a ed.
- BRENNAN, M. L. et al.. Prognostic value of myeloperoxidase in patients with chest pain. **N Engl J Med** 349(17): 1595-1604, 2003.
- CALZA, L., G. et al. Prevalence of diabetes mellitus, hyperinsulinaemia and metabolic syndrome among 755 adult patients with HIV-1 infection. **Int J STD AIDS** 22(1): 43-45, 2011.
- CAPILI, B., et al. HIV and General Cardiovascular Risk. **J Assoc Nurses AIDS Care**, 2011.
- CHU, C.; P. SELWYN, A. Complications of HIV infection: a systems-based approach. **Am Fam Physician** 83(4): 395-406, 2011.
- EL-BEJJANI, D. S. et al. Higher plasma myeloperoxidase levels are not associated with an increased risk for cardiovascular events in HIV-infected adults. **HIV Clin Trials** 9(3): 207-211, 2008.
- FRIIS-MOLLER, N. et al. Combination antiretroviral therapy and the risk of myocardial infarction. **N Engl J Med** 349(21): 1993-2003, 2003.
- KALIL, R.S. et al. Infecção HIV no cérebro: as bases biológicas da neuropsicologia. **DST – J Bras D Sex Transm**, v.17, p71-75, 2005.
- LI, X. et al. CD4 and CD8 enumeration for HIV monitoring in resource-constrained settings. **Cytometry B Clin Cytom** 76(2): 118-126, 2009.
- LORIA, V. et al. Myeloperoxidase: a new biomarker of inflammation in ischemic heart disease and acute coronary syndromes. **Mediators Inflamm** 2008: 135625, 2008.
- MASIA, M. et al. The role of C-reactive protein as a marker for cardiovascular risk associated with antiretroviral therapy in HIV-infected patients. **Atherosclerosis** 195(1): 167-171 2007.
- MORROW, D. A. et al. Concurrent evaluation of novel cardiac biomarkers in acute coronary syndrome: myeloperoxidase and soluble CD40 ligand and the risk of recurrent ischaemic events in TACTICS-TIMI 18. **Eur Heart J** 29(9): 1096-1102, 2008.
- NICHOLLS, S. J.; HAZEN, S. L. The role of myeloperoxidase in the pathogenesis of coronary artery disease. **Jpn J Infect Dis** 57(5): S21-22, 2004.

- NICHOLLS, S. J.; HAZEN, S. L. Myeloperoxidase, modified lipoproteins, and atherogenesis. **J Lipid Res** 50 Suppl: S346-351, 2009.
- O'GORMAN, M. R., NICHOLSON, J. K. Adoption of single-platform technologies for enumeration of absolute T-lymphocyte subsets in peripheral blood. **Clin Diagn Lab Immunol** 7(3): 333-335, 2000.
- PALLELA, F.J., Jr., et al., Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. **N Engl J Med**, 338(13): p. 853-60, 1998.
- ROSS, R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. **N Engl J Med** 340(2): 115-126, 1999.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose, Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq Bras Cardiol**, v. 88, supl. I, 2007.
- SURESH, D. R. et al. Total antioxidant capacity--a novel early bio-chemical marker of oxidative stress in HIV infected individuals. **J Biomed Sci** 16: 61, 2009.
- THOMPSON, M. A. et al. Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2010 recommendations of the International AIDS Society-USA panel. **JAMA** 304(3): 321-333, 2010.
- VOLP, A.C.P. et al. Capacidade dos biomarcadores inflamatórios em predizer a síndrome metabólica. **Arq Bras de End & Met**, v.52, p. 537-549, 2008.
- WEBER, M.; HAMM, C. Novel biomarkers--the long march from bench to bedside." **Eur Heart J** 29(9): 1079-1081, 2008.

CAPÍTULO 2

PRIMEIRO ARTIGO

Avaliação dos valores percentuais de linfócitos T Cd4+ obtidos estritamente por citometria de fluxo e estimados pelo contador hematológico no monitoramento imunológico de pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV)

Evaluation of the percentages of CD4+ T lymphocytes obtained strictly by flow cytometry and those estimated by hematologic counter on immune monitoring of patients with human immunodeficiency virus (HIV)

Danielle Cristyane Kalva Borato¹, Fabiane Cristina Erdmann¹, Harli Pasquini Netto¹, Luciana Maria Borba¹, Emerson Carraro², Sônia Regina Weber Ribas³, José Carlos Rebuglio Velloso^{1*}

1 Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Campus Uvaranas, Ponta Grossa - PR, Brasil

2 Universidade do Centro-Oeste do Paraná - UNICENTRO, Departamento de Farmácia, Campus CEDETEG, Guarapuava - PR, Brasil

3 Serviço de Assistência Especializada (SAE) – Ponta Grossa – PR, Brasil

*Autor para correspondência: Universidade Estadual de Ponta Grossa, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Av. General Carlos Cavalcanti, 4748, Uvaranas, Ponta Grossa - PR, Brasil, CEP: 84030-900; telefone: +55-42-32203120; E-mail: josevellosa@yahoo.com.br (J.C.R. Velloso)

RESUMO

Considerando que a contagem percentual de linfócitos T Cd4+ pode adicionar informação prognóstica para pacientes infectados pelo HIV, o objetivo deste estudo foi avaliar os valores percentuais de linfócitos T Cd4+, de 81 pacientes, obtidos a partir do citômetro de fluxo e estimados através da citometria de fluxo em conjunto com o contador hematológico. Foi utilizado o teste *t-Student* ($p < 0,05$) para comparação de médias entre valores emparelhados, as possíveis correlações foram determinadas pela correlação de *Pearson* e a concordância entre os resultados foi verificada pelo método de *Bland-Altman*. Foram identificadas diferenças significativas entre os valores relativos de linfócitos T Cd4+, sendo maiores para o contador hematológico ($p < 0,05$). Correlações positivas e significantes ($p < 0,01$) foram encontradas entre as metodologias para estrato de Cd4+ < 200 células/mL ($r = 0,93$), entre 200-500 células/mL ($r = 0,65$) e > 500 células/mL ($r = 0,81$). Os limites de concordância foram $1,0 \pm 3,8\%$ para o estrato de Cd4+ < 200 células/mL, aproximadamente $2,2 \pm 13,5\%$ para o estrato de Cd4+ entre 200-500 células/mL e aproximadamente $6,2 \pm 20,4\%$ para o estrato > 500 células/mL. As diferenças verificadas nos valores percentuais de linfócitos T Cd4+ obtidas por diferentes metodologias poderiam causar conflito quando utilizados nas decisões clínicas relacionadas ao tratamento e a assistência de pessoas infectadas pelo HIV.

Palavras chaves: HIV; linfócitos T CD4 positivos; citometria de fluxo

ABSTRACT

Considering that counting the percentage of CD4 T lymphocytes can add prognostic information patients infected with HIV, the aim of this study was to evaluate the percentage values of CD4+ T lymphocytes from 81 patients determined by flow cytometry and estimated by flow cytometry in conjunction with the hematology counter. Means were compared through the Student t test. Pearson`s correlation was determined and the agreement between results was tested by Bland-Altman. The level of significance was $p < 0.05$. We found significantly higher mean difference between the relative values of CD4+ T lymphocytes to the hematologic counter ($p < 0.05$), for all strata studied. Positive and significant correlations ($p < 0.01$) were found between the stratum CD4 < 200 cells/mL ($r = 0.93$), between 200-500 cells/mL ($r = 0.65$) and > 500 cells/mL ($r = 0.81$). The limits of agreement were $1.0 \pm 3.8\%$ for the stratum of CD4 < 200 cells/mL, approximately $2.2 \pm 13.5\%$ for the stratum of CD4 between 200-500 cells/mL and approximately $6.2 \pm 20.4\%$ for the stratum > 500 cells/mL. The differences in the percentages of CD4 + T lymphocytes obtained by different methodologies could lead to conflict when used in clinical decisions related to treatment and care of people infected with HIV.

Key words: HIV; CD4 positive T lymphocytes; flow cytometry

INTRODUÇÃO

A história natural da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) é caracterizada por um declínio progressivo dos linfócitos T *helper* (linfócitos T Cd4+)¹. Esta depleção ocorre porque o vírus infecta e mata os linfócitos T Cd4+, sendo o principal mecanismo por morte celular programada (apoptose). Estas células funcionam como reguladores e amplificadores da resposta imune e estão associadas à imunopatogenia da infecção pelo HIV². Assim, a diminuição dos linfócitos T Cd4+ resulta em um comprometimento do sistema imunológico e a progressão da infecção pelo vírus, tendo como principal consequência o aparecimento de doenças oportunistas, a evolução para AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Humana) e o óbito por condições associadas à infecção³.

O nível de linfócitos T Cd4+ é considerado um dos parâmetros imunológicos mais importantes em indivíduos infectados pelo HIV para a avaliação de seu prognóstico e estado de deficiência imunológica, para determinar o início da terapia antiretroviral, monitorar a eficácia deste tratamento, avaliar a necessidade de iniciar ou interromper a profilaxia para infecções oportunistas⁴ e estabelecer o diagnóstico de AIDS⁵.

Deste modo, a quantificação de linfócitos T Cd4+ (imunofenotipagem por citometria de fluxo) é um procedimento indispensável na avaliação dos pacientes portadores do HIV⁶. A imunofenotipagem fornece informações importantes sobre os leucócitos do sistema

imunológico, distinguindo linfócitos totais (Cd45+), os linfócitos T (Cd3+), e os subtipos de linfócitos T que compreendem duas subpopulações: as células T *helper* (linfócitos T Cd3+/Cd4+) e as células T citotóxicas (linfócitos T Cd3+/Cd8+)⁷. Assim, a contagem dos linfócitos totais e os valores percentuais das subpopulações linfocitárias podem ser determinados pela citometria de fluxo, utilizando o anticorpo monoclonal Cd45+, em associação aos anticorpos Cd3+, Cd4+ e Cd8+⁸.

A contagem absoluta de linfócitos T Cd4+ pode ser influenciada por fatores biológicos que afetem a contagem total de leucócitos e de linfócitos, tais como o uso de medicamentos supressores da medula óssea, infecções agudas (sepse, malária e tuberculose, por exemplo) e gravidez (que pode levar a hemodiluição)⁹. Além destes fatores biológicos, pode existir também uma variação devido a fatores metodológicos, como as diferenças nos métodos e equipamentos utilizados^{3,10, 11}.

Vários estudos relataram que variações na contagem percentual de linfócitos T Cd4+ são parâmetros mais estáveis que variações na contagem absoluta para avaliar a progressão da doença^{12,13,14,15}. Além disso, valores relativos de linfócitos T Cd4+ no início da terapia antiretroviral estariam associados ao risco de progressão da doença independente de outros fatores clínicos, incluindo contagem absoluta de linfócitos T Cd4+¹⁶.

A principal preocupação quanto à utilização da contagem percentual de células T Cd4+ é como a variação dos resultados poderia ter influência sobre as decisões clínicas relacionadas ao tratamento e à assistência de pessoas infectadas pelo HIV.

Portanto, o objetivo deste estudo foi determinar a variação das contagens relativas de linfócitos T Cd4+ entre duas metodologias diferentes: i) estimativa dos valores percentuais pelo contador hematológico e pelo citômetro de fluxo, e ii) determinação destes valores utilizando somente o citômetro de fluxo.

MATERIAIS E MÉTODO

Participantes

Foram selecionados 81 indivíduos portadores do vírus HIV. Todos os participantes receberam esclarecimentos sobre a pesquisa, assinaram e dataram o formulário de consentimento livre e esclarecido. O estudo foi aprovado na Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Ponta Grossa (N. 0443710-21/2010).

Análise laboratorial

As amostras biológicas foram coletadas pelo sistema a vácuo (Vacutainer®), contendo o anticoagulante EDTA-K3, sendo obtidos dois tubos com 5 mL de sangue venoso, um para análise no citômetro de fluxo (imunofenotipagem) e um para análise no equipamento hematológico tradicional (identificação por impedância e rugosidade). Todas as análises foram realizadas dentro de 6 horas após a coleta.

Como na imunofenotipagem, a determinação dos linfócitos T Cd4+ é o parâmetro imunológico mais importante em indivíduos infectados pelo HIV, os valores percentuais da contagem de linfócitos obtidos somente pelo citômetro de fluxo e pela combinação dos dois equipamentos (citômetro de fluxo e contador hematológico) foram comparados.

Valores percentuais de linfócitos T Cd4+ estimados pelo Equipamento Hematológico associado à citometria de fluxo

As amostras foram submetidas à contagem celular utilizando o contador hematológico Cell-Dyn 3700 (Abbot®, Québec, Canadá) e o citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson-Biociences®, San Jose, Califórnia, EUA). Primeiro, obteve-se a contagem absoluta de linfócitos totais por meio do equipamento de hematologia. Em seguida, o valor absoluto dos linfócitos totais do equipamento de hematologia foi combinado com os valores absolutos de linfócitos T Cd4+ obtidos por citometria de fluxo, obtendo o valor relativo dos linfócitos T Cd4+.

Valores percentuais de linfócitos T Cd4+ obtidos pelo Citômetro de fluxo

Realizou-se a imunofenotipagem de cada amostra utilizando o protocolo para contagem de células T do método padrão Multitest/TruCount (anticorpos monoclonais Cd45+/Cd3+/Cd8+/Cd4+) pelo citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson-Biociences®, San Jose, Califórnia, EUA), para obter a contagem relativa de células T Cd4+.

Análise estatística

Foi realizado o teste de *Kolmogorov-Smirnov* para verificar a normalidade, sendo que os valores obtidos apresentaram distribuição normal. Os procedimentos estatísticos utilizados envolveram a análise descritiva (média e desvio-padrão), de correlação e de comparação entre as duas metodologias. Os dados foram analisados através do teste *t-Student* para comparação de médias entre valores emparelhados. Para verificar a correlação entre as variáveis foi

utilizada a correlação de *Pearson*. Na análise de diferentes metodologias foi verificada a concordância entre os resultados, pela representação gráfica pelo método de *Bland-Altman*. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. Os dados foram tratados através do programa estatístico MedCalc®.

RESULTADOS

Os 81 indivíduos selecionados foram agrupados realizando uma estratificação de acordo com a contagem absoluta de linfócitos T Cd4+: 18 amostras com contagem de células T Cd4+ inferiores a 200 células/mL (132 ± 47 células/mL), 34 amostras entre 200 e 500 células/mL (342 ± 74 células/mL) e 29 amostras com contagem superior a 500 células/mL (701 ± 156 células/mL).

Os resultados das contagens percentuais de linfócitos T Cd4+ obtidos diretamente pelo citômetro de fluxo e os valores estimados pelo contador hematológico, estão representados na Tabela 1.

Tabela 1. Resultados de média, desvio padrão e a comparação de médias da contagem percentual dos linfócitos T Cd4+ obtidos pelas duas metodologias para os estratos estudados.

Estrato de Cd4+				
(células/mL)	n	Citômetro de fluxo	Contador Hematológico	<i>p</i>
< 200	18	$10,99 \pm 3,99$	$11,86 \pm 5,10$	0,040*
200 – 500	34	$22,89 \pm 6,47$	$25,08 \pm 9,07$	0,037*
> 500	29	$29,84 \pm 10,46$	$36,07 \pm 16,78$	0,002*

* diferença de média estatisticamente significativa, teste *t-Student*.

A correlação dos valores percentuais de linfócitos T Cd4+ obtidas pelas duas metodologias para os três estratos de Cd4+ estudados, está representada na Figura 1A, 2A e 3A, assim como, a concordância representadas pelos gráficos de *Bland-Altman*, demonstradas nas Figuras 1B, 2B e 3B.

Observando-se o gráfico de *Bland-Altman* pode-se perceber que a diferença entre as duas medidas foi de 1,0% para o estrato de Cd4+ < 200 células/mL, e os limites de concordância foram de -2,8 a 4,8%. Nos estratos de Cd4 entre 200 e 500 células/mL, assim como para a contagem de linfócitos superiores a 500 células/mL observou-se limites de concordância mais amplos 2,2% (-11,4 a 15,7%) e 6,2% (-14,1 a 26,6%) respectivamente, em relação ao extrato de Cd4+ < 200 células/mL.

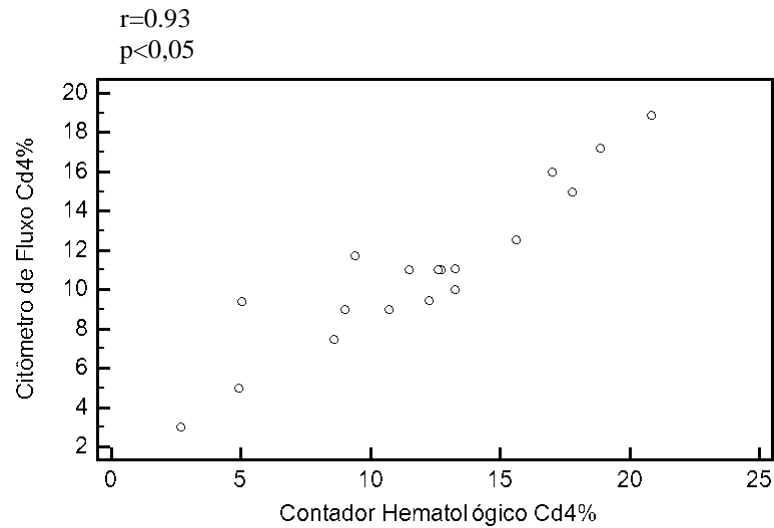
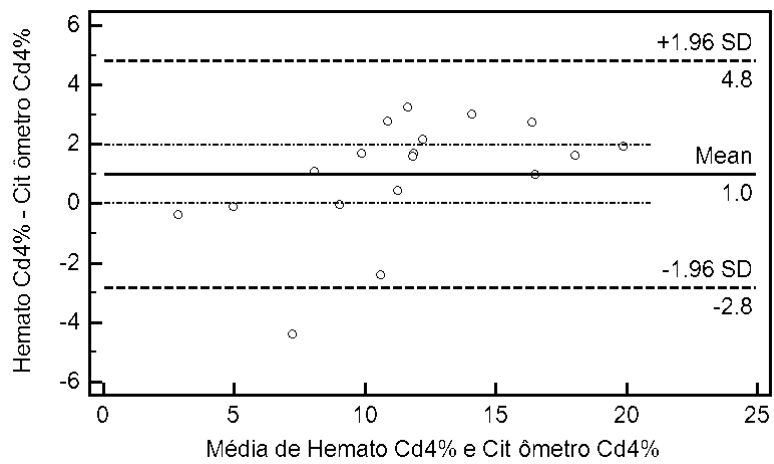
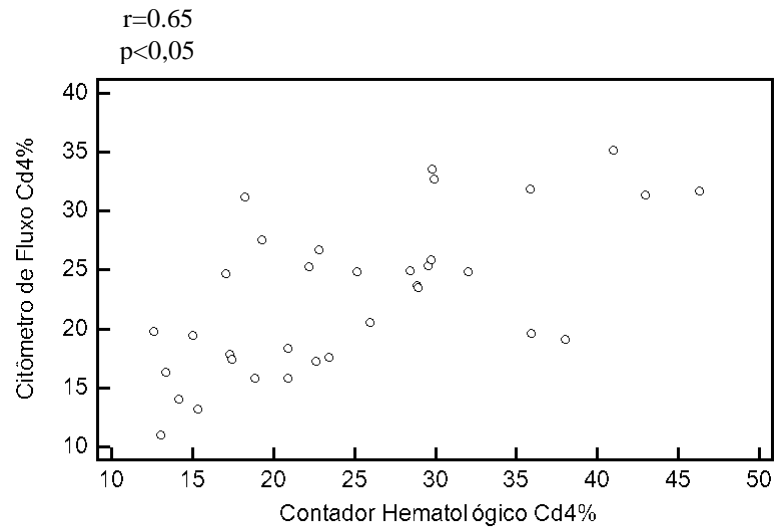
A**B**

Figura 1 - Correlação dos valores percentuais de Cd4+ (A) e os limites de concordância entre os valores estimados por meio gráfico de *Bland-Altman* (B) obtidos pelo contador hematológico e pelo citômetro de fluxo no estrato de Cd4 < 200 células/mL.

A



B

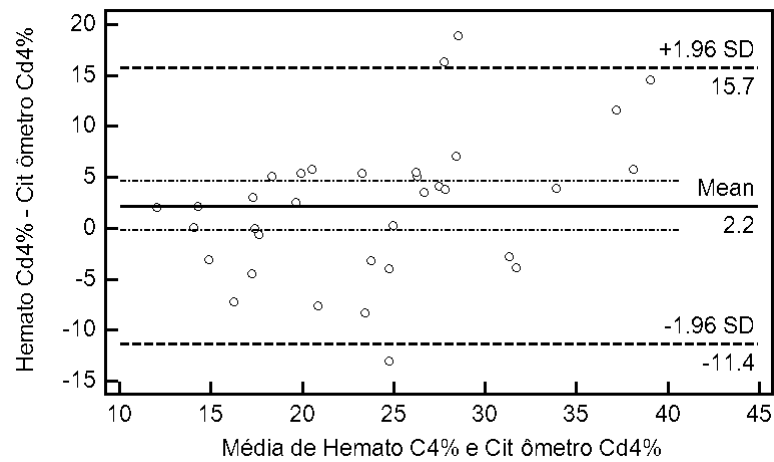
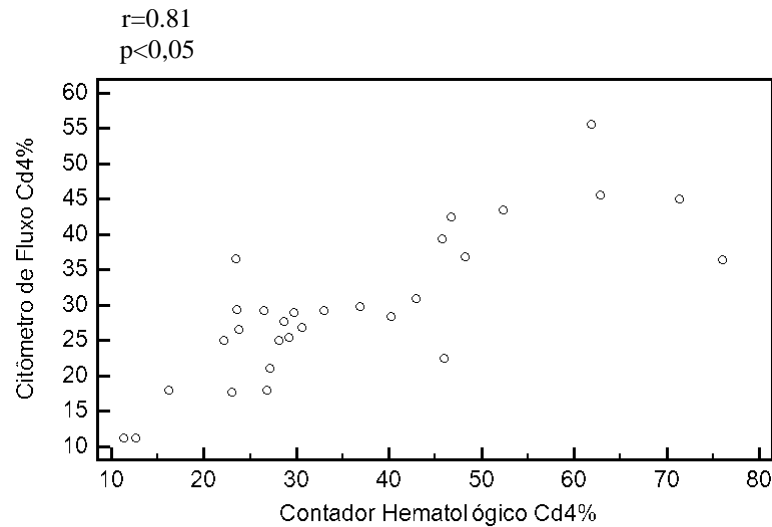


Figura 2 - Correlação dos valores percentuais de Cd4+ (A) e os limites de concordância entre os valores estimados por meio gráfico de *Bland-Altman* (B) obtidos pelo contador hematológico e pelo citômetro de fluxo no estrato de Cd4 entre 200 e 500 células/mL.

A



B

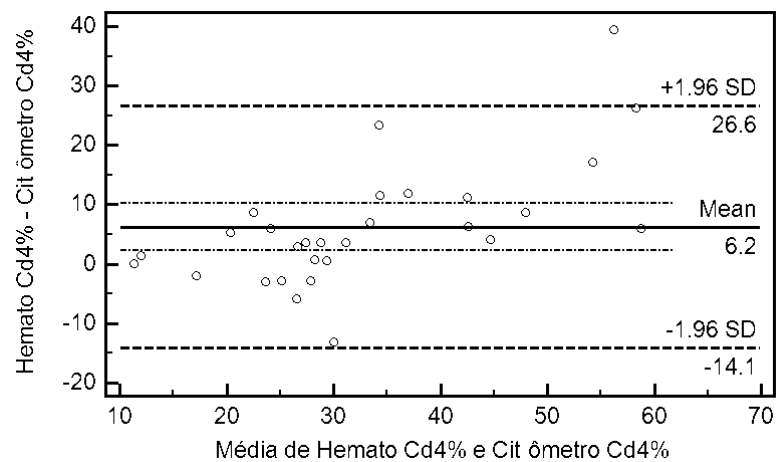


Figura 3 - Correlação dos valores percentuais de Cd4+ (A) e os limites de concordância entre os valores estimados por meio gráfico de *Bland-Altman* (B) obtidos pelo contador hematológico e pelo citômetro de fluxo no estrato de Cd4 > 500 células/mL.

DISCUSSÃO

Neste estudo, foi analisada a variabilidade entre as contagens relativas de linfócitos T Cd4+ geradas pelo citômetro de fluxo e aquelas estimadas por uma metodologia alternativa em que se faz necessária a combinação de resultados do equipamento hematológico (contagem absoluta de linfócitos totais) e o citômetro de fluxo (contagem absoluta de

linfócitos T Cd4+). Observou-se que estimativa da contagem dos linfócitos T Cd4+ a partir do contador hematológico foi superior em valores relativos para os três estratos estudados, variando de aproximadamente 1%, para o estrato Cd4+ <200 células/mL, até 6%, para o estrato >500 células/mL. Uma possível explicação para essas diferenças é a forma utilizada para a determinação dos linfócitos totais pelos dois equipamentos. A variabilidade adicional da contagem é devida a uma maior imprecisão na forma com que o equipamento hematológico classifica os linfócitos totais¹⁷.

Os resultados encontrados corroboram com informações relatadas anteriormente mostrando que a contagem de linfócitos obtida de analisadores hematológicos está propensa a erros^{17,18,19,20} e, por outro lado, a utilização de um *gate* em células marcadas com Cd45+ associado a um parâmetro de dispersão de luz, utilizando o citômetro de fluxo confere melhor precisão e exatidão na quantificação dos linfócitos em relação aos parâmetros de volume celular e condutância dos contadores hematológicos⁶.

Na comparação dos valores percentuais de linfócitos T Cd4+ no estrato de Cd4+ < 200 células/mL pelo contador hematológico e pelo citômetro de fluxo verificou-se que as medidas têm uma forte correlação ($r= 0.93$). Entretanto elas não apresentam uma boa concordância, uma vez que pelo gráfico de *Bland-Altman* (Figura 2A) pode-se perceber que a diferença entre as duas metodologias foi de 1,0% de linfócitos T Cd4+ e os limites de concordância foram de $\pm 3,8\%$.

Em relação ao estrato de Cd4+ entre 200 e 500 células/mL, nota-se que as medidas são moderadamente correlacionadas ($r=0.65$). Apesar da correlação, a Figura 2B (gráfico de *Bland-Altman*), demonstra limites de concordância mais amplos de aproximadamente $2,2\pm 13,5\%$. Assim como para a contagem de linfócitos superiores a 500 células/mL com limites de concordância aproximadamente de $6,2\pm 20,4\%$ como demonstrado na Figura 3B (gráfico de *Bland-Altman*), apesar de este estrato apresentar uma forte correlação ($r=0.81$).

De forma semelhante, MacLennan et al. (2007)²¹, ao avaliarem o uso de citômetros de fluxo, para fornecerem apenas a contagem absoluta de células T Cd4+, associados à contagem de linfócitos totais em analisadores hematológicos, para obter a percentagem de linfócitos T Cd4+, obtiveram viés de 0,92% e limites de concordância -5,83% para 7,66%, através do FacsCount e do método Multitest/Tubos Trucount no citômetro de fluxo FACSCalibur, para a contagem absoluta de linfócitos T Cd4+ inferior a 200 células/mL.

A principal importância da utilização dos valores percentuais de linfócitos T Cd4+ estaria no fato da contagem absoluta variar frente a estímulos independentes da infecção pelo HIV e os valores percentuais serem menos sujeitos a essa variabilidade²².

Se considerarmos os valores percentuais de linfócitos T Cd4+ para a avaliação imunológica dos indivíduos infectados pelo HIV, podemos observar que para o estrato de Cd4+ < 200 células/mL a contagem poderia ser subestimada em até 4,8% ou superestimada em até 2,8%, para o estrato de Cd4+ entre 200 e 500 células/mL poderia ser subestimada em até 15,7% ou superestimada em até 11,4 e para o estrato de Cd4+ > 500 células/mL poderia ser subestimada em até 26,6% ou superestimada em até 14,1%, como verificado nos gráficos de *Bland-Altman* para os três estratos. Neste estudo, a plotagem de *Bland-Altman* foi necessária para verificar a concordância entre os resultados pelas duas metodologias, uma vez que a utilização do coeficiente de correlação de *Pearson* não possibilita uma análise mais acurada dos níveis de concordância entre as medidas obtidas individualmente²³. Nesse sentido, a análise de concordância utilizada entre o contador hematológico e o citômetro de fluxo indicou limites relativamente amplos para os estratos analisados, indicando elevada variabilidade.

CONCLUSÃO

Neste estudo, foi possível constatar que, apesar de uma boa correlação entre os valores percentuais de linfócitos T Cd4+ estimados pelas duas metodologias, a concordância entre as medidas obtidas individualmente indicou limites relativamente amplos para todos os estratos de Cd4+ estudados.

Do ponto de vista clínico, as diferenças dadas pelos limites de concordância dos valores percentuais de linfócitos T Cd4+ poderiam causar conflito nas decisões relacionadas ao tratamento e a assistência de pessoas infectadas pelo HIV. Portanto, a interpretação da contagem percentual de linfócitos T Cd4+ para o monitoramento imunológico dos pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana deve ser criteriosa levando em consideração que variações podem ocorrer devido à metodologia utilizada.

REFERÊNCIAS

1. Mogensen TH, Melchjorsen J, Larsen CS, Paludan SR. Innate immune recognition and activation during HIV infection. *Retrovirology* 2010;7:54.
2. Alimonti JB, Ball TB, Fowke KR. Mechanisms of CD4+ T lymphocyte cell death in human immunodeficiency virus infection and AIDS. *J Gen Virol* Jul 2003;84(Pt 7):1649-1661.

3. Brasil, Recomendações para Terapia Antiretroviral em Adultos infectados pelo HIV. Ministério da Saúde. **Programa Nacional de DST e AIDS** 2008;7a ed.
4. Li X, Breukers C, Ymeti A, Lunter B, Terstappen LW, Greve J. CD4 and CD8 enumeration for HIV monitoring in resource-constrained settings. *Cytometry B Clin Cytom* Mar 2009;76(2):118-126.
5. 1997 revised guidelines for performing CD4+ T-cell determinations in persons infected with human immunodeficiency virus (HIV). *Centers for Disease Control and Prevention MMWR Recomm Rep*. Jan 10 1997;46(RR-2):1-29.
6. O'Gorman MR, Nicholson JK. Adoption of single-platform technologies for enumeration of absolute T lymphocyte subsets in peripheral blood. *Clin Diagn Lab Immunol* May 2000;7(3):333-335.
7. Janeway C. A. TP, Walport M. *Immunobiology* Garland Science ed. New York, 2005.
8. Janossy G, Jani IV, Bradley NJ, Bikoue A, Pitfield T, Glencross DK. Affordable CD4(+)-T-cell counting by flow cytometry: CD45 gating for volumetric analysis. *Clin Diagn Lab Immunol* Sep 2002;9(5):1085-1094.
9. Hoffman J. GJV, Colebunders R., McKellar M. Role of the CD4 count in HIV management. *Future Medicine* 2010;4(1):27-39.
10. Bussmann H, Wester CW, Masupu KV, et al.. Low CD4+ T-lymphocyte values in human immunodeficiency virus-negative adults in Botswana. *Clin Diagn Lab Immunol* Sep 2004;11(5):930-935.
11. Aboulker JP, Autran B, Beldjord K, Touraine F, Debre P. Consistency of routine measurements of CD4+, CD8+ peripheral blood lymphocytes. *J Immunol Methods* Oct 2 1992;154(2):155-161.
12. Moore DM, Hogg RS, Yip B, Craib K, Wood E, Montaner JS. CD4 percentage is an independent predictor of survival in patients starting antiretroviral therapy with absolute CD4 cell counts between 200 and 350 cells/microL. *HIV Med* Sep 2006;7(6):383-388.
13. Pirzada Y, Khuder S, Donabedian H. Predicting AIDS-related events using CD4 percentage or CD4 absolute counts. *AIDS Res Ther* 2006;3:20.
14. Guiguet M, Kendjo E, Carcelain G, et al.. CD4+ T-cell percentage is an independent predictor of clinical progression in AIDS-free antiretroviral-naive patients with CD4+ T-cell counts >200 cells/mm³. *Antivir Ther* 2009;14(3):451-457.
15. Hulgán T, Raffanti S, Kheshti A, et al.. CD4 lymphocyte percentage predicts disease progression in HIV-infected patients initiating highly active antiretroviral therapy with CD4 lymphocyte counts >350 lymphocytes/mm³. *J Infect Dis* Sep 15 2005;192(6):950-957.
16. Hulgán T, Shepherd BE, Raffanti SP, et al.. Absolute count and percentage of CD4+ lymphocytes are independent predictors of disease progression in HIV-infected persons initiating highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis* Feb 1 2007;195(3):425-431.
17. Simson E, Groner W. Variability in absolute lymphocyte counts obtained by automated cell counters. *Cytometry* Mar 15 1995;22(1):26-34.
18. Malone JL, Simms TE, Gray GC, Wagner KF, Burge JR, Burke DS. Sources of variability in repeated T-helper lymphocyte counts from human immunodeficiency virus type 1-infected patients: total lymphocyte count fluctuations and diurnal cycle are important. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1990;3(2):144-151.
19. Brando B, Barnett D, Janossy G, et al.. Cytofluorometric methods for assessing absolute numbers of cell subsets in blood. European Working Group on Clinical Cell Analysis. *Cytometry* Dec 15 2000;42(6):327-346.

20. Glencross D, Scott LE, Jani IV, Barnett D, Janossy G. CD45-assisted PanLeucogating for accurate, cost-effective dual-platform CD4+ T-cell enumeration. *Cytometry* Apr 15 2002;50(2):69-77.
21. MacLennan CA, Liu MK, White SA, et al.. Diagnostic accuracy and clinical utility of a simplified low cost method of counting CD4 cells with flow cytometry in Malawi: diagnostic accuracy study. *BMJ* Jul 28 2007;335(7612):190.
22. Pirzada Y, Khuder S, Donabedian H. Predicting AIDS-related events using CD4 percentage or CD4 absolute counts. *AIDS Res Ther* 2006;3:20.
23. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Int J Nurs Stud* Aug 2010;47(8):931-936.

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

CAPÍTULO 3
SEGUNDO ARTIGO

Avaliação de parâmetros laboratoriais, proteína C reativa e mieloperoxidase em indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana

Danielle Cristyane Kalva Borato^A, Gisele Chibinski Parabocz^A, Sônia Regina Weber Ribas^B, Carlos Augusto Kalva-Filho^C, Luciana Maria Borba^A, Carmen Antonia Sanches Ito^A, Larissa Bail^A, Fábio André dos Santos^D, José Carlos Rebuglio Velloso^{A*}

^A Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Campus Uvaranas, Ponta Grossa - PR, Brasil

^B Serviço de Assistência Especializada (SAE) – Ponta Grossa – PR, Brasil

^C Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG, Departamento de Educação Física, Campus Uvaranas, Ponta Grossa - PR, Brasil

^D Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG, Departamento de Odontologia, Campus Uvaranas, Ponta Grossa - PR, Brasil

*Autor para correspondência: Universidade Estadual de Ponta Grossa, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Av. General Carlos Cavalcanti, 4748, Uvaranas, Ponta Grossa - PR, Brasil, CEP: 84030-900; telefone: +55-42-32203120; E-mail: josevellosa@yahoo.com.br (J.C.R. Velloso)

RESUMO

Objetivos: Analisar as concentrações séricas da mieloperoxidase (MPO; 1.11.1.7) e outros parâmetros laboratoriais em pacientes infectados pelo HIV (tratados ou não com antiretrovirais) e indivíduos não-infectados. **Métodos:** Participaram do estudo 154 voluntários, sendo 47 não-infectados (grupo controle - CON), 27 indivíduos infectados não tratados (grupo NTARV) e 80 indivíduos tratados (grupo TARV). Foram analisadas as contagens de linfócitos T Cd4+ e carga viral dos pacientes infectados; e hemograma, glicemia de jejum, colesterol total (COL), HDL-col, LDL-col, triglicerídios, MPO e PCR-us de todos os participantes do estudo. **Resultados:** Foram encontradas diferenças significativamente aumentada para glicose, COL, LDL-col, e triglicérides no grupo TARV e reduções significativas nos níveis do HDL-col, para os grupos TARV e NTARV. Níveis significativamente elevados da PCR-us foram observados apenas para o grupo TARV, enquanto os níveis da MPO estavam elevados nos grupos TARV e NTARV de forma significativa. Houve correlação da MPO com a PCR-us ($r=0,21$, $p=0,032$) para os pacientes infectados pelo HIV e nenhuma correlação significativa da MPO com os demais parâmetros analisados foi observada. **Conclusão:** A investigação de biomarcadores precoces é importante para o diagnóstico, sendo a mieloperoxidase uma importante opção no acompanhamento clínico de indivíduos infectados pelo HIV. Os níveis séricos da MPO apresentaram correlação com a PCR-us, e apresentaram-se elevados nos indivíduos infectados pelo HIV, indicando possível valor preditivo de eventos cardiovasculares nestes pacientes. Porém, são necessários estudos prospectivos para confirmar o papel da mieloperoxidase como biomarcador de risco cardiovascular na população portadora do vírus HIV.

Palavras-chave: risco cardíaco; HIV; mieloperoxidase

INTRODUÇÃO

Com o sucesso da introdução da *HAART - therapy antiretroviral active highly*, observou-se uma diminuição da morbidade e mortalidade [1] e, um conseqüente aumento do risco cardiovascular em indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV)[2].

Com o tempo, a infecção pelo HIV se amplifica por meio de mecanismos adicionais pró-aterogênicos relacionados às vias de ativação imune, inflamação, coagulação e alteração das lipoproteínas (por exemplo, partículas de lipoproteína de alta densidade), contribuindo para aumento do risco cardiovascular[3].

Além disso, as alterações metabólicas secundárias à terapia antiretroviral, que resultam em um perfil metabólico desfavorável, caracterizado por hiperglicemia, resistência à insulina, dislipidemias e aumento da adiposidade visceral, também estão envolvidas ao risco cardiovascular precoce nesta população[4, 5].

Neste sentido vários estudos têm demonstrado que a patogênese de doenças cardiovasculares em pacientes infectados pelo HIV então relacionados aos fatores da própria infecção e também ao tratamento antiretroviral[6-8].

A aterosclerose é um processo dinâmico e a instalação, progressão, vulnerabilidade e/ou ruptura da placa provocam uma cascata de eventos envolvendo diversas células e mediadores inflamatórios[9]. Portanto, uma compreensão mais profunda da fisiopatologia da aterosclerose tem orientado os estudos científicos para a avaliação de novos marcadores biológicos como potenciais ferramentas para o diagnóstico clínico[10-13].

Há um interesse crescente em identificar uma substância cujos níveis na corrente sanguínea identifiquem o processo aterosclerótico ativo, ou seja, biomarcadores que refletem a fisiopatologia aguda da inflamação, vulnerabilidade e/ou ruptura da placa[13].

Deste modo, como a inflamação desempenha um papel fundamental na iniciação e progressão da aterosclerose[9], a proteína C-reativa ultra-sensível (PCR-us), um marcador inflamatório de fase aguda, apresenta especial significado para caracterizar o risco cardiovascular[10-12] e, dentre os biomarcadores, é considerada o mais consagrado na prática clínica. Entretanto, tem sido demonstrado que outros biomarcadores investigados atualmente permitem prever o risco de infarto do miocárdio, independente do monitoramento laboratorial realizado pela PCR-us[14].

Dentre estes biomarcadores, a mieloperoxidase (MPO; 1.11.1.7) tem sido apresentada com características de mensuração acessíveis para, no futuro, fazer parte da rotina

laboratorial[10]. A MPO é uma enzima bactericida liberada pela ativação e degranulação de leucócitos neutrófilos. Na doença cardiovascular, a MPO exerce um potente efeito pró-aterogênico, participando da instabilização e da ruptura da placa, incluindo a ativação de metaloproteinases, a alteração do tônus vasomotor e certas propriedades antiinflamatórias por meio da redução da biodisponibilidade do óxido nítrico derivado do endotélio e através da oxidação da fração lipoprotéica de baixa densidade do colesterol (LDL-colesterol)[15].

Deste modo, vários estudos estão destacando a determinação da MPO como um biomarcador sensível e precoce de risco cardiovascular[16-20]. Entretanto, ainda são escassos na literatura estudos que avaliam a MPO como estratégia de monitoramento laboratorial no risco cardiovascular em pacientes infectados pelo HIV.

Com isso, os objetivos do presente estudo foram analisar as concentrações séricas da mieloperoxidase e outros parâmetros laboratoriais em pacientes infectados pelo HIV (tratados ou não com antiretrovirais) e indivíduos não-infectados.

MATERIAIS E MÉTODOS

Participantes

Foram selecionados para o estudo 154 indivíduos, todos maiores de 18 anos de idade, sendo 107 portadores do vírus HIV atendidos no Centro de Testagem e Aconselhamento/Serviço de Assistência Especializada do Município de Ponta Grossa (CTA/SAE) e 47 indivíduos não-infectados pelo HIV, do Laboratório Universitário de Análises Clínicas (LUAC) da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), como voluntários da pesquisa.

Estes participantes foram alocados em três grupos: 80 indivíduos HIV - positivos tratados com terapia antiretroviral (TARV), 27 HIV - positivos não tratados (NTARV) e 47 indivíduos não-infectados formaram o grupo controle (CON).

Foram incluídos no grupo TARV somente os pacientes que estavam em terapia antiretroviral por pelo menos três meses, no grupo NTARV aqueles que nunca haviam iniciado a terapia.

Todos os indivíduos estavam em jejum por pelo menos 12 horas antes da coleta de sangue e em todos os grupos foram selecionados apenas voluntários que não estivessem tomando qualquer medicamento que pudesse afetar o perfil lipídico. Foram usados como critérios de exclusão do estudo, os tradicionais fatores de risco cardíaco, sendo excluídos todos que apresentaram algum histórico de doença cardiovascular.

Dados da história clínica dos participantes do estudo como idade e sexo, história atual da infecção (uso ou não de antiretrovirais, classe de antiretroviral utilizada e data de início da terapia) e outros medicamentos em uso foram obtidos no momento da coleta de sangue.

Todos os participantes receberam esclarecimentos sobre a pesquisa, assinaram e dataram o termo de consentimento livre e esclarecido. O estudo foi aprovado na Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Ponta Grossa (N. 0443710-21/2010).

Análise laboratorial

Foram avaliados parâmetros imunológicos dos pacientes infectados, assim como os parâmetros bioquímicos e hematológicos de todos os participantes do estudo que preencheram os critérios de inclusão.

As amostras biológicas de sangue venoso foram coletadas, por meio de sistema a vácuo (Vacutainer®), sendo 10,0 mL de sangue colhido em tubos sem anticoagulante e 10,0 mL de sangue total em tubos com anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético). Os tubos sem anticoagulante foram imediatamente centrifugados para obtenção de soro e separados em duas alíquotas, uma para avaliação dos parâmetros bioquímicos e outra congelada a -80°C para posterior análise da mieloperoxidase e PCR-us. Os tubos com anticoagulante foram utilizados para análise dos parâmetros imunológicos e hematológicos.

Análise dos parâmetros imunológicos

Foi realizada a imunofenotipagem de cada amostra utilizando o protocolo para contagem de células T do método padrão Multitest/TruCount pelo citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson-Biociences®, San Jose, Califórnia, EUA), para obter a contagem absoluta de células T CD4+ (células/mL).

A análise virológica foi realizada por meio da determinação da carga viral, uma avaliação quantitativa do RNA do vírus HIV através da técnica bDNA e kit HIV 3.0 RNA em sistema automatizado System 340® (Siemens®). Os resultados foram expressos em nº de cópias/mL. Os limites de detecção para carga viral foram de 50 cópias/mL (limite mínimo) e 500.000 cópias/mL (limite máximo).

Análise dos parâmetros bioquímicos

Os exames de glicose, colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL-colesterol) e triglicérides foram mensurados pelo método de automação no aparelho BT 3000 plus

(Wiener Lab®, Rosario, Argentina). Quando foram observados níveis de triglicérides < 400 mg/dL, a equação de Friedwald ($\text{LDL-colesterol} = [\text{Colesterol total}] - [\text{HDL-colesterol}] - ([\text{Triglicérides}]/5)$) foi usada para determinar os níveis de lipoproteína de baixa densidade (LDL-colesterol). A dosagem de glicose, colesterol total, triglicérides foi realizada pelo método enzimático, enquanto que o HDL-colesterol pelo colorimétrico sem precipitação.

Análise dos biomarcadores

Os níveis de mieloperoxidase no soro foram determinados pela técnica de enzima imunoensaio (ELISA- *Enzyme-linked immuno sorbent assay*) no formato sanduíche (Immunology Consultants Laboratory®, USA).

Os níveis de PCR-us foram determinados pelo método de turbidimetria ligada ao látex, no aparelho BT 3000 plus (Wiener Lab®, Rosario, Argentina).

Análise dos parâmetros hematológicos

As amostras foram submetidas à contagem celular utilizando o contador hematológico Cell-Dyn 3700 (Abbot®, Québec, Canadá), obtendo-se os valores de leucócitos totais e contagem absoluta de neutrófilos.

Tratamento estatístico

As características dos pacientes foram apresentadas como média e desvio padrão para as variáveis contínuas e para as variáveis categóricas como números e percentuais. Foi realizado o teste de *Kolmogorov-Smirnov* para verificar a normalidade dos dados laboratoriais. Para as variáveis que não apresentaram distribuição normal, a transformação logarítmica foi realizada antes da análise paramétrica. Com isso os dados foram apresentados de forma descritiva por meio de mediana e intervalo interquartil. As possíveis diferenças entre os grupos foram evidenciadas por meio do teste de Qui-Quadrado (χ^2) para as variáveis categóricas e pelo teste *t-student* ou pela análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de *Tukey*, para as variáveis contínuas. Para as possíveis correlações entre os parâmetros laboratoriais e os níveis de MPO foi utilizada a correlação de *Spearman*. Em todas as análises o nível de significância foi pré-fixado em de $p < 0,05$. Os dados foram tratados através do programa estatístico STATISTICA 7 (Statsoft, EUA).

RESULTADOS

Preencheram os critérios de inclusão 154 indivíduos, sendo as características dos grupos comparados apresentadas na Tabela 1. A contagem absoluta de linfócitos T CD4+ e a determinação da carga viral estabeleceram o perfil imunológico semelhante para os pacientes infectados pelo vírus HIV incluídos no estudo (Tabela 1).

Tabela 1 – Caracterização dos grupos estudados: controle (CON), tratado com antiretrovirais (TARV) e não-tratado (NTARV).

Características	COM (n=47)	TARV (n=80)	NTARV (n=27)	Valor p
Idade, média±DP *	37,62±14,52	41,14±10,12	38,17±9,86	0,27
Gênero, n. (%)†				
Masculino	17 (36,2)	32,0 (40,0)	11,0 (40,7)	0,89
Feminino	30 (63,8)	48,0 (60,0)	16,0 (59,3)	0,89
CD4+ (células/mL), média±DP **	----	506±252	530±339	0,36
C.V. (< 50 cópias/mL), n. (%)†	----	54 (67,5)	20 (74,1)	0,52
Tratamento (anos), média±DP	----	5,9±3,7	----	----
Terapia Antiretroviral				
IPs, n. (%)	----	51 (63,8)	----	----
ITRNs, n. (%)	----	78 (97,5)	----	----
ITRNNs, n. (%)	----	26 (32,5)	----	----

* ANOVA

† χ^2

** teste *t-student*

---- não se aplica;

C.V., carga viral;

IPs, inibidores da protease; ITRNs, inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos; ITRNNs, inibidores da transcriptase reversa não-análogos de nucleosídeos.

A Tabela 2 demonstra os resultados da análise laboratorial para os grupos estudados. As diferenças significativas observadas entre os biomarcadores de risco cardíaco (MPO e PCR-us) nos grupos estudados estão demonstradas na Figura 1.

Tabela 2 - Mediana e intervalo interquartil das análises laboratoriais para o grupo controle (CON), tratado com antiretrovirais (TARV) e não-tratado (NTARV).

Parâmetros laboratoriais	CON (n=47)	TARV (n=80)	NTARV (n=27)
<i>Bioquímicos</i>			
Glicose (mg/dL)	85 (79-91) ^a	92 (85-100) ^b	89 (85-99) ^{ab}
HDL-colesterol (mg/dL)	53 (45-68) ^a	42 (33-51) ^b	41 (34-51) ^b
LDL-colesterol (mg/dL)	85 (71-96) ^a	116 (91-138) ^b	101 (77-123) ^{ab}
Colesterol total (mg/dL)	156 (142-183) ^a	191 (160-213) ^b	171 (142-202) ^{ab}
Triglicérides (mg/dL)	97 (70-128) ^a	151 (101-238) ^b	128 (81-180) ^{ab}
<i>Biomarcadores</i>			
Mieloperoxidase (µg/L)	104 (80-142) ^a	207 (109-374) ^b	165 (95-325) ^b
PCR-us (mg/L)	1,21(0,49-3,41) ^a	2,39 (1,26-6,11) ^b	1,97 (0,69-3,80) ^{ab}
<i>Hematológicos</i>			
Leucócitos totais (10 ³ cél/mL)	5.3 (4.7-7.0) ^a	4.8 (4.2-6.4) ^a	5.4 (4.4-5.7) ^a
Neutrófilos (10 ³ cél/mL)	3.2 (2.6-3.5) ^a	1.2 (0.5-2.7) ^a	2.0 (0,6-3.0) ^a

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$, ANOVA com pós-teste de Tukey).

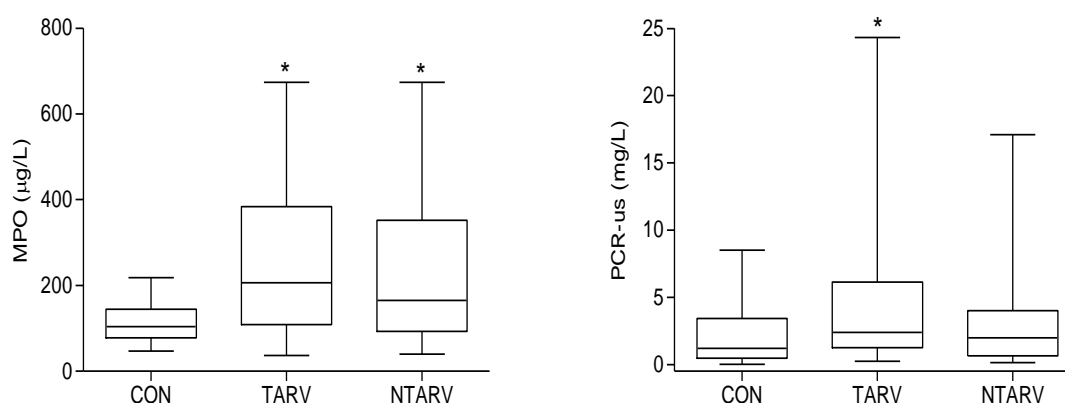


Figura 1 - Medianas e intervalos interquartis das concentrações séricas de mieloperoxidase (MPO) e proteína C reativa ultrasensível (PCR-us), obtidas nos grupos controle (CON), não tratado (NTARV) e tratado (TARV).

* Diferença significativa com relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

Para o grupo controle não foi encontrado nenhum valor acima de 350 µg/L, considerado *cut-off* para alto risco cardiovascular[17], enquanto 30% e 26% dos indivíduos

apresentaram MPO acima deste ponto de corte, para os grupos TARV e NTARV, respectivamente.

No que diz respeito à PCR-us, valores acima de 3 mg/L são associados a eventos cardiovasculares futuros[21], sendo observadas elevações para 28% dos indivíduos do grupo controle, 43,75% do grupo TARV e 29,63% do grupo NTARV.

Os níveis de mieloperoxidase sérica também foram analisados realizando a sua correlação com os parâmetros laboratoriais e imunológicos (CD4+ e carga viral). A MPO apresentou correlação positiva e significativa somente com a PCR-us na população infectada pelo HIV (Figura 2), não sendo encontrada nenhuma correlação significativa da MPO para os outros parâmetros estudados.

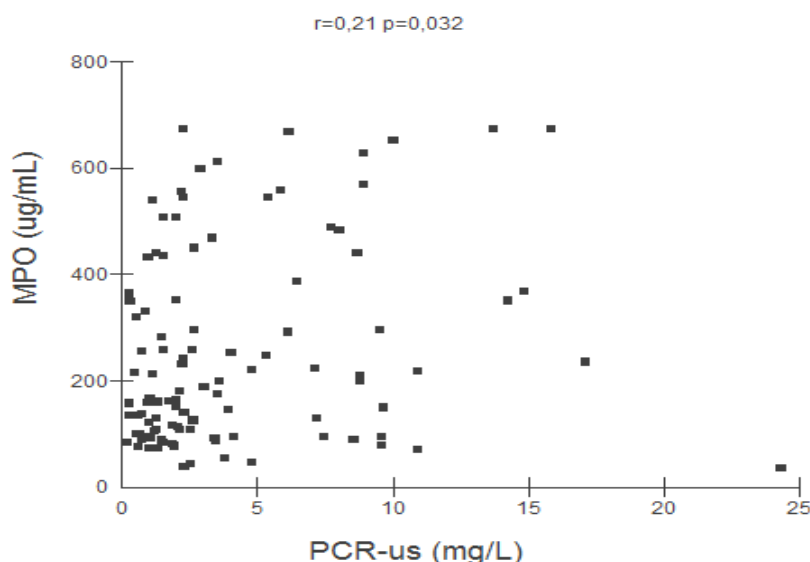


Figura 2 – Correlação de *Spearman* para as concentrações séricas de mieloperoxidase (MPO) e proteína C reativa ultrasensível (PCR-us), obtida para os pacientes infectados pelo vírus HIV.

DISCUSSÃO

No presente estudo foram encontradas diferenças significativas para todos os parâmetros bioquímicos analisados no grupo em terapia antiretroviral, sendo encontradas elevações para glicose, LDL-colesterol, colesterol total e triglicérides, em relação ao grupo controle. Além disso, foram observadas reduções significativas nos níveis do HDL-colesterol no grupo TARV e, também no grupo não-tratado, quando comparados ao grupo controle. Os resultados encontrados concordam com informações prévias, mostrando que a dislipidemia

relacionada à TARV é caracterizada por elevação nos níveis de colesterol total e triglicérides, com redução nos níveis de colesterol HDL, com ou sem elevação do LDL colesterol[22].

Embora existam muitas descrições de que a atividade protetora do HDL seja diretamente proporcional aos níveis de HDL-2 e inversamente aos níveis de HDL-3, atualmente, a avaliação clínica se baseia quase que exclusivamente sobre o HDL total, sem levar em conta as subclasses individuais, estando, portanto, já bem sedimentado o conceito de que o HDL-colesterol está fortemente relacionado à redução da doença arterial coronariana, o que indica que a redução do HDL estaria relacionada à elevação do risco da doença arterial coronariana[23]. Ocorrem níveis reduzidos do HDL colesterol devido à ativação imune precoce durante a infecção pelo HIV e estão relacionados ao processo aterosclerótico devido às suas atividades antioxidantes e antiinflamatórias[22].

Além das alterações lipídicas, os pacientes em uso de TARV podem apresentar alterações no metabolismo da glicose e ambos são conhecidos fatores de risco cardiovasculares. As anormalidades da homeostase da glicose são comuns entre os pacientes em uso da TARV e sua exposição cumulativa eleva a incidência de diabetes mellitus, como mostrou o estudo D:A:D (*Data Collection on Adverse Events of Anti-HIV Drugs*) - um estudo longitudinal que acompanhou 11 coortes em todo o mundo[24].

Portanto, as alterações nos fatores de risco cardiovasculares são comuns em indivíduos com infecção pelo HIV e, desta forma, as estratégias de prevenção são de grande importância nesta população. Neste estudo, foram avaliados biomarcadores cardiovasculares de instabilidade da placa e inflamação: PCR-us e MPO.

Foram encontrados níveis significativamente mais elevados para o biomarcador PCR-us apenas para o grupo infectado pelo HIV em uso de terapia antiretroviral. Os resultados obtidos para os níveis de PCR-us concordam com os obtidos por Masiá et al. (2007) [25] e por Guimarães et al. (2008)[26], que demonstraram uma elevação significativa de PCR-us para os pacientes em uso de TARV, sugerindo aumento de risco cardiovascular.

Para o biomarcador MPO foram encontrados níveis significativamente mais elevados nos grupos de pacientes infectados pelo HIV (tratados ou não com a terapia antiretroviral), em relação ao grupo controle, o que pode ser indicativo de alterações cardiovasculares importantes na população HIV - positiva. Ross et al., em 2009[27], relataram que marcadores inflamatórios como a MPO e PCR-us, estão associados com a ativação do endotélio, e ambos estão associados com a espessura interna da artéria carótida, além disso, apresentaram níveis significativamente aumentados para os pacientes infectados pelo HIV em terapia

antiretroviral, apoiando o papel da inflamação na ativação endotelial e de doenças cardiovasculares na infecção pelo HIV.

O presente estudo também mostrou uma correlação significativa da MPO com a PCR-us ($r=0,21$, $p=0,032$) para os pacientes infectados pelo HIV, de forma semelhante a Meuwere et al. (2007)[28], que, em um estudo caso – controle, com 3.375 indivíduos saudáveis, além de demonstrarem uma correlação significativa da MPO com a PCR-us ($r=0,25$, $p<0,001$), também demonstraram que níveis elevados de MPO estão associados ao aumento de risco futuro de eventos cardiovasculares, independente de fatores de risco tradicionais. Como o aumento dos níveis sistêmicos de MPO tem sido associado à identificação de eventos cardiovascular futuros mesmo com biomarcadores clássicos como a troponina e a PCR-us normais[14, 16], e independentemente de fatores de risco tradicionais[28], a correlação positiva entre os dois biomarcadores neste estudo sugere um risco aumentado de eventos cardiovasculares em pacientes infectados pelo HIV.

Os dados obtidos com o *cut-off* para aumento do risco cardiovascular demonstram um maior percentual de indivíduos com valores de PCR-us (CON=28%, TARV=43,75% e NTARV=29,63%), que se pode associar a eventos cardiovasculares futuros, em relação ao biomarcador MPO (CON=0%, TARV=30% e NTARV=26%), para os grupos estudados.

Isto pode ser explicado pelo fato da PCR-us ser um marcador inflamatório de fase aguda global e, portanto, sua determinação não ser específica para processos vasculares, podendo ocorrer elevações modestas dos níveis de PCR em uma variedade de condições inflamatórias (artrite reumatóide, doença maligna, vasculite, etc.). Assim, a inflamação local não está tão bem refletida pela determinação da PCR, provavelmente impedindo o seu valor para a fase aguda da doença cardiovascular[11, 13].

Além disso, é interessante observar que, entre os grupos estudados, pacientes tratados com TARV apresentaram maior percentagem de indivíduos com valores de MPO (30%) e PCR-us (44%) acima dos valores *cut-off* para aumento do risco cardiovascular.

Observou-se ainda, que o tempo médio de tratamento foi de $5,9\pm 3,7$ anos e a maior parte dos pacientes utilizava antiretrovirais da classe dos ITRNs e IPs. Os resultados encontrados concordam com informações relatadas em outros estudos, que demonstraram a elevação da incidência de eventos cardiovasculares com o tempo de exposição à terapia antiretroviral[29]. Friis-Moller et al (2007)[30], avaliaram a incidência de eventos cardiovasculares nos pacientes expostos a IPs ou a ITRNNs e demonstraram que a incidência de eventos cardiovasculares aumentou nos pacientes em uso de IPs, principalmente nos

expostos por mais de seis anos, sendo que este risco pode ser em parte explicado pela dislipidemia produzida por este fármaco.

CONCLUSÃO

A investigação de biomarcadores precoces tem se tornado cada vez mais importante para complementar o diagnóstico clínico em doenças cardiovasculares. Com base em estudos recentes, a MPO pode ser excelente candidata como biomarcador precoce de risco cardíaco, além dos marcadores tradicionais para a rotina laboratorial.

Neste estudo, foi verificado que os níveis séricos da MPO estavam elevados e apresentaram correlação com a PCR-us, um biomarcador clássico de risco cardíaco, sugerindo valor preditivo de eventos cardiovasculares nos pacientes infectados pelo HIV. Porém, são necessários estudos prospectivos para confirmar seu papel como biomarcador de risco cardiovascular na população portadora do vírus HIV, que apresenta uma manifestação diversificada de sintomas, devido às alterações bioquímicas e imunológicas observadas como resultado da replicação do vírus no organismo e até mesmo pela utilização da terapia antiretroviral.

REFERÊNCIAS

- [1] Palella FJ Jr, Delaney KM, Moorman AC, et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med*, 1998. 338(13): p. 853-60.
- [2] Hsue PY, et al. Progression of atherosclerosis as assessed by carotid intima-media thickness in patients with HIV infection. *Circulation*, 2004. 109(13): p. 1603-8.
- [3] Baker JV, Lundgren JD. Cardiovascular implications from untreated human immunodeficiency virus infection. *Eur Heart J*, 2011. 32(8): p. 945-51.
- [4] Mondy K, Tebas P. Cardiovascular risks of antiretroviral therapies. *Annu Rev Med*, 2007. 58: p. 141-55.
- [5] Anuurad E, Semrad A, Berglund L. Human immunodeficiency virus and highly active antiretroviral therapy-associated metabolic disorders and risk factors for cardiovascular disease. *Metab Syndr Relat Disord*, 2009. 7(5): p. 401-10.
- [6] Dube MP, et al. Relationship of body composition, metabolic status, antiretroviral use, and HIV disease factors to endothelial dysfunction in HIV-infected subjects. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2010. 26(8): p. 847-54.
- [7] Calza L, et al. Prevalence of diabetes mellitus, hyperinsulinaemia and metabolic syndrome among 755 adult patients with HIV-1 infection. *Int J STD AIDS*, 2011. 22(1): p. 43-5.
- [8] Capili B, Anastasi JK, Ogedegbe O. HIV and General Cardiovascular Risk. *J Assoc Nurses AIDS Care*, 2011.
- [9] Ross, R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 1999. 340(2): p. 115-26.

- [10] Weber M, Hamm C. Novel biomarkers--the long march from bench to bedside. *Eur Heart J*, 2008. 29(9): p. 1079-81.
- [11] Morrow DA, et al. Concurrent evaluation of novel cardiac biomarkers in acute coronary syndrome: myeloperoxidase and soluble CD40 ligand and the risk of recurrent ischaemic events in TACTICS-TIMI 18. *Eur Heart J*, 2008. 29(9): p. 1096-102.
- [12] Nagesh CM, Roy A. Role of biomarkers in risk stratification of acute coronary syndrome. *Indian J Med Res*, 2010. 132(5): p. 627-33.
- [13] Chan D, Ng LL. Biomarkers in acute myocardial infarction. *BMC Med*, 2010. 8: p. 34.
- [14] Brennan ML, et al. Prognostic value of myeloperoxidase in patients with chest pain. *N Engl J Med*, 2003. 349(17): p. 1595-604.
- [15] Nicholls SJ, Hazen SL. Myeloperoxidase, modified lipoproteins, and atherogenesis. *J Lipid Res*, 2009. 50 Suppl: p. S346-51.
- [16] Zhang R, et al. Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease. *JAMA*, 2001. 286(17): p. 2136-42.
- [17] Baldus S, et al. Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes. *Circulation*, 2003. 108(12): p. 1440-5.
- [18] Rudolph V, et al. Diagnostic value of MPO plasma levels in patients admitted for suspected myocardial infarction. *Int J Cardiol*, 2010.
- [19] Ikitimur B; Karadag B. Role of myeloperoxidase in cardiology. *Future Cardiol*, 2010. 6(5): p. 693-702.
- [20] Tang WH, et al. Plasma myeloperoxidase predicts incident cardiovascular risks in stable patients undergoing medical management for coronary artery disease. *Clin Chem*, 2011. 57(1): p. 33-9.
- [21] Saito M, et al. Relations of plasma high-sensitivity C-reactive protein to traditional cardiovascular risk factors. *Atherosclerosis*, 2003. 167(1): p. 73-9.
- [22] Oh J, Hegele RA. HIV-associated dyslipidaemia: pathogenesis and treatment. *Lancet Infect Dis*, 2007. 7(12): p. 787-96.
- [23] Williams PT, Feldman DE. Prospective study of coronary heart disease vs. HDL2, HDL3, and other lipoproteins in Gofman's Livermore Cohort. *Atherosclerosis*, 2011. 214(1): p. 196-202.
- [24] De Wit S, et al. Incidence and risk factors for new-onset diabetes in HIV-infected patients: the Data Collection on Adverse Events of Anti-HIV Drugs (D:A:D) study. *Diabetes Care*, 2008. 31(6): p. 1224-9.
- [25] Masia M, et al. The role of C-reactive protein as a marker for cardiovascular risk associated with antiretroviral therapy in HIV-infected patients. *Atherosclerosis*, 2007. 195(1): p. 167-71.
- [26] Guimaraes MM, et al. High-sensitivity C-reactive protein levels in HIV-infected patients treated or not with antiretroviral drugs and their correlation with factors related to cardiovascular risk and HIV infection. *Atherosclerosis*, 2008. 201(2): p. 434-9.
- [27] Ross AC, 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(7): p. 1119-27.
- [28] Meuwese MC, et al. Serum myeloperoxidase levels are associated with the future risk of coronary artery disease in apparently healthy individuals: the EPIC-Norfolk Prospective Population Study. *J Am Coll Cardiol*, 2007. 50(2): p. 159-65.
- [29] Friis-Moller N, et al. Combination antiretroviral therapy and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med*, 2003. 349(21): p. 1993-2003.

- [30] Friis-Moller N, et al. Class of antiretroviral drugs and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med*, 2007. 356(17): p. 1723-35.

CAPÍTULO 4

CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As conseqüências da morbidade por doenças cardiovasculares são inúmeras e o elevado índice de mortalidade é um dos importantes componentes dessa lista. Além das doenças crônicas metabólicas, as complicações das doenças infecciosas também são importantes causas de mortalidade na população brasileira e dentre elas, encontra-se a AIDS, síndrome de imunodeficiência provocada pelo vírus HIV. Considerando a elevada incidência de mortalidade por doenças cardiovasculares aterotrombóticas e o envolvimento da mieloperoxidase na progressão da doença e também a elevada incidência de morte por complicações relacionadas à deficiência na defesa do organismo pelo sistema imunológico, foram avaliadas: i) metodologias utilizadas no monitoramento da infecção pelo HIV, cujos resultados demonstraram a importância da escolha da metodologia como possível fator de variação da conclusão clínica e ii) a utilização da PCR ultrasensível e mieloperoxidase séricas como elementos laboratoriais importantes a avaliação cardiovascular dos pacientes infectados pelo vírus HIV. Com as novas informações alcançadas e novos estudos, espera-se estabelecer condições para o uso de marcadores específicos e mais precoces, a fim de permitir medidas preventivas e terapêuticas eficientes na promoção da saúde destes pacientes.

Os benefícios de resultados promissores neste tipo de investigação se estendem à prevenção e a melhoria da saúde do paciente pré-disposto, menores taxas de internação e de custos para o sistema público de saúde. Neste contexto, a mieloperoxidase pode ser um parâmetro de grande potencial preditivo de risco cardíaco e, portanto, a sua aplicação no monitoramento laboratorial de auxílio ao diagnóstico clínico deve ser investigada de forma mais aprofundada em estudos prospectivos.

ANEXO

PARECER COEP UEPG



PARECER N° 21/2010
Protocolo: 04437/10

Em reunião ordinária, realizada dia 29 de Abril de 2010, a Comissão de Ética em Pesquisa, **APROVOU** o protocolo de pesquisa intitulado "**Determinação dos níveis séricos da enzima Mieloperoxidase na saúde e na síndrome de imunodeficiência adquirida - Correlação com perfil lipídico, estatus antioxidante**" de responsabilidade do pesquisador José Carlos Rebuglio Velloso.

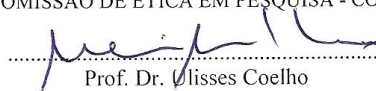
Conforme Resolução CNS 196/96, solicitamos que sejam apresentados a esta Comissão, relatórios sobre andamento da pesquisa, conforme modelo (<http://www.uepg.br/coep/>).

Data para entrega do relatório parcial: abril de 2011

Data para entrega do relatório final: Abril de 2012.

Ponta Grossa, 30 de Abril de 2010.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP


.....
Prof. Dr. Ulisses Coelho
Coordenador