

**ÉERICA ALESSANDRA ROCHA ALVES**

**Avaliação, *in vitro*, da influência dos antiretrovirais zidovudina, lamivudina, efavirenz e lopinavir/ritonavir isolados ou associados sobre a função fagocitária e produção de radicais de oxigênio por neutrófilos e monócitos de indivíduos normais**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Brasília/DF**

**2008**

# DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Avaliação, *in vitro*, da influência dos antiretrovirais zidovudina, lamivudina, efavirenz e lopinavir/ritonavir isolados ou associados sobre a função fagocitária e produção de radicais de oxigênio por neutrófilos e monócitos de indivíduos normais**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Patologia Molecular.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. MARIA IMACULADA MUNIZ BARBOZA JUNQUEIRA**

**Brasília/DF**

**2008**

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho as quatro pessoas mais importantes da minha vida. Ao meu marido Otávio, que sempre está ao meu lado e que me apóia incondicionalmente na batalha pela realização dos meus sonhos, à minha filha Ana Beatriz, razão da minha existência e luz que me impulsiona para novos caminhos e aos meus pais Francisca e Irany que são sempre fonte de amor e carinho e exemplos de perseverança e capacidade de superação.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus que sempre está ao meu lado.

Em especial à minha querida professora e orientadora Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira, que acreditou e confiou na minha capacidade profissional e propiciou a oportunidade para a realização deste trabalho, pelo exemplo que é como mãe, mulher e profissional que luta pela realização dos seus sonhos, por ter dividido prontamente seus conhecimentos e experiências que com certeza contribuíram para que eu me tornasse uma profissional e uma pessoa melhor e pela atenção e amizade a mim dispensadas.

Ao professor Carlos Eduardo Tosta, pelos ensinamentos passados sempre em um ambiente de amizade, de valorização e de respeito aos alunos.

À Shirley Claudino Pereira Couto, amiga que mesmo sofrendo os "males de uma gestação", sempre esteve disposta a ajudar durante a fase experimental desta pesquisa.

Aos amigos do laboratório de Imunologia Selma Aparecida Souza Kückelhaus, César Augustus Fernandes da Silva e Rosana Regina Saldanha pelo apoio e amizade demonstrados ao longo desta jornada.

Ao Sr. José Siqueira da Silva, pela confecção das lâminas utilizadas nos experimentos.

Em especial às minhas cunhadas Amélia da Silva Cucaroli e Fabiana da Silva Cucaroli, que muitas vezes cansadas dos afazeres diários abdicaram do próprio conforto para prontamente me auxiliar no que fosse necessário.

Aos meus sogros, Terezinha da Silva Cucaroli e Antônio Cucaroli Neto, *in memoriam*, pessoas com profunda capacidade de doarem-se e que geraram uma família da qual me orgulho de fazer parte.

Às minhas irmãs Brígida Adélia Rocha Alves e Lívia Maria Rocha Alves e a minha tia Francisca Auricélia Furtado Rocha que propiciaram o ambiente familiar, às vezes atribulado, mas sempre acolhedor que fez de mim a pessoa que sou hoje.

À Maria das Dores Lima Arcanjo, meu braço direito, que cuidou de minha filha com o carinho e o amor necessário e me ofereceu o ambiente tranqüilo para a realização deste trabalho.

Aos amigos Aristana Medeiros e Renan Medeiros, que prontamente me cederam o microscópio para a realização da leitura das lâminas deste trabalho e que sempre estiveram disponíveis para colaborar com o que eu precisasse.

Ao Dr. Rogério Luiz Scapini, Assessor Técnico da Área de Manejo Logístico de Medicamentos, da Unidade de Assistência e Tratamento do Programa Nacional de DST e AIDS, que prontamente atendeu ao pedido para a obtenção dos medicamentos utilizados nesta pesquisa.

Aos voluntários que generosamente doaram o sangue utilizado neste trabalho, muitíssimo obrigada!

# SUMÁRIO

<b>Lista de abreviaturas.....</b>	<b>VII</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>IX</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>XII</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>12</b>
<b>3. Material e métodos.....</b>	<b>14</b>
3.1. Delineamento experimental.....	15
3.2. Grupos de estudo e aspectos éticos.....	17
3.3. Concentrações dos antiretrovirais utilizadas nos experimentos <i>in vitro</i> .....	21
3.4. Avaliação da influência das drogas antiretrovirais sobre a fagocitose efetuada por neutrófilos e monócitos pelos receptores para padrões moleculares de patógenos.....	22
3.5. Avaliação da influência das drogas antiretrovirais sobre a fagocitose efetuada por neutrófilos e monócitos pelos receptores para opsoninas.....	23
3.6. Preparo da suspensão estoque de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> para o teste de fagocitose.....	24
3.7. Preparo das leveduras para uso no teste de fagocitose.....	25
3.8. Avaliação da influência dos antiretrovirais sobre a produção de radicais de oxigênio por fagócitos pelo teste do <i>nitroblue tetrazolium</i> (NBT).....	25
3.9. Análise estatística.....	27
<b>4. Resultados.....</b>	<b>28</b>
<b>4.1. Influência do tratamento de fagócitos de indivíduos normais com zidovudina, lamivudina, efavirenz ou lopinavir/ritonavir isoladamente ou associados sobre a capacidade fagocitária.....</b>	<b>29</b>
4.1.1. Influência do tratamento <i>in vitro</i> de neutrófilos de indivíduos normais com efavirenz sobre a fagocitose pelos receptores para padrões moleculares de patógenos.....	30
4.1.2. Influência do tratamento <i>in vitro</i> de neutrófilos de indivíduos normais com a associação lopinavir/ritonavir sobre a fagocitose por receptores para padrões moleculares de patógenos.....	32
4.1.3. Influência do tratamento <i>in vitro</i> de neutrófilos de indivíduos normais com a associação zidovudina, lamivudina e lopinavir/ritonavir sobre a fagocitose pelos receptores para padrões moleculares de patógenos.....	34

4.1.4. Influência do tratamento <i>in vitro</i> de neutrófilos de indivíduos normais com zidovudina, lamivudina isoladamente e da associação zidovudina, lamivudina e efavirenz sobre a fagocitose pelos receptores para padrões moleculares de patógenos.....	<b>36</b>
4.1.5. Análise comparativa da influência do tratamento <i>in vitro</i> de neutrófilos de indivíduos normais com zidovudina, lamivudina, efavirenz e lopinavir/ritonavir isolados ou associados sobre a fagocitose mediada por receptores para padrões moleculares de patógenos.....	<b>40</b>
4.1.6. Influência do tratamento <i>in vitro</i> de neutrófilos de indivíduos normais com efavirenz sobre a fagocitose pelos receptores para opsoninas.....	<b>42</b>
4.1.7. Influência do tratamento <i>in vitro</i> de neutrófilos de indivíduos normais com zidovudina, lamivudina, efavirenz, lopinavir/ritonavir isoladamente e das associações zidovudina, lamivudina com efavirenz ou lopinavir/ritonavir sobre a fagocitose pelos receptores para opsoninas.....	<b>44</b>
4.1.8. Análise comparativa da influência do tratamento <i>in vitro</i> de neutrófilos de indivíduos normais com zidovudina, lamivudina, efavirenz e lopinavir/ritonavir isolados ou associados sobre a fagocitose mediada por opsoninas.....	<b>50</b>
4.1.9. Influência do tratamento <i>in vitro</i> de monócitos de indivíduos normais com lopinavir/ritonavir sobre a fagocitose pelos receptores para padrões moleculares de patógenos.....	<b>52</b>
4.1.10. Influência do tratamento <i>in vitro</i> de monócitos de indivíduos normais com a associação zidovudina, lamivudina e lopinavir/ritonavir sobre a fagocitose pelos receptores para padrões moleculares de patógenos.....	<b>54</b>
4.1.11. Influência do tratamento <i>in vitro</i> de monócitos de indivíduos normais com zidovudina sobre a fagocitose pelos receptores para padrões moleculares de patógenos.....	<b>56</b>
4.1.12. Influência do tratamento <i>in vitro</i> de monócitos de indivíduos normais com lamivudina, efavirenz e da associação composta por zidovudina, lamivudina e efavirenz sobre a fagocitose pelos receptores para padrões moleculares de patógenos.....	<b>58</b>
4.1.13. Análise comparativa da influência do tratamento <i>in vitro</i> de monócitos de indivíduos normais com zidovudina, lamivudina, efavirenz e lopinavir/ritonavir isolados ou associados sobre a fagocitose pelos receptores para padrões moleculares de patógenos.....	<b>62</b>
4.1.14. Influência do tratamento <i>in vitro</i> de monócitos de indivíduos normais com lopinavir/ritonavir sobre a fagocitose pelos receptores para opsoninas.....	<b>65</b>

4.1.15. Influência do tratamento <i>in vitro</i> de monócitos de indivíduos normais com zidovudina, lamivudina, efavirenz e das associações compostas por zidovudina, lamivudina, efavirenz ou lopinavir/ritonavir sobre a fagocitose pelos receptores para opsoninas.....	67
4.1.16. Análise comparativa da influência do tratamento <i>in vitro</i> de monócitos de indivíduos normais com zidovudina, lamivudina, efavirenz e lopinavir/ritonavir isolados ou associados sobre a fagocitose pelos receptores para opsoninas.....	73
<b>4.2. Influência do tratamento de fagócitos de indivíduos normais com zidovudina, lamivudina, efavirenz e lopinavir/ritonavir isolados ou associados sobre a produção de radicais de oxigênio.....</b>	<b>75</b>
4.2.1. Influência do tratamento <i>in vitro</i> de fagócitos de indivíduos normais com zidovudina sobre o percentual de redução do <i>nitroblue tetrazolium</i> basal e estimulado.....	76
4.2.2. Influência do tratamento <i>in vitro</i> de fagócitos de indivíduos normais com lamivudina sobre o percentual de redução do <i>nitroblue tetrazolium</i> basal e estimulado.....	78
4.2.3. Influência do tratamento <i>in vitro</i> de fagócitos de indivíduos normais com efavirenz sobre o percentual de redução do <i>nitroblue tetrazolium</i> basal e estimulado.....	80
4.2.4. Influência do tratamento <i>in vitro</i> de fagócitos de indivíduos normais com lopinavir/ritonavir sobre o percentual de redução do <i>nitroblue tetrazolium</i> basal e estimulado.....	82
4.2.5. Influência do tratamento <i>in vitro</i> de fagócitos de indivíduos normais com zidovudina, lamivudina e efavirenz sobre o percentual de redução do <i>nitroblue tetrazolium</i> basal e estimulado.....	84
4.2.6. Influência do tratamento <i>in vitro</i> de fagócitos de indivíduos normais com zidovudina, lamivudina e lopinavir/ritonavir sobre o percentual de redução do <i>nitroblue tetrazolium</i> basal e estimulado.....	86
4.2.7. Análise comparativa da influência do tratamento <i>in vitro</i> de fagócitos de indivíduos normais com zidovudina, lamivudina, efavirenz e lopinavir/ritonavir isolados ou associados sobre o percentual de redução do <i>nitroblue tetrazolium</i> basal e estimulado.....	88
<b>5. Discussão.....</b>	<b>89</b>
<b>6. Conclusões.....</b>	<b>105</b>
<b>7. Referências bibliográficas.....</b>	<b>109</b>
<b>8. Anexo I: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....</b>	<b>132</b>
<b>9. Anexo II: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....</b>	<b>134</b>
<b>10. Anexo III: Soluções e reagentes.....</b>	<b>136</b>
<b>11. Anexo IV: Tabelas das análises estatísticas.....</b>	<b>142</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AZT</b>	Zidovudina
<b>APV</b>	Amprenavir
<b>CCR2</b>	Receptor para a quimiocina MCP-1
<b>CCR5</b>	Receptor para a quimiocina MIP-1 $\beta$
<b>CXCR4</b>	Receptor para a quimiocina SDF-1
<b>CD11a</b>	Cadeia $\alpha$ do antígeno-1 associado à função dos linfócitos
<b>CD11b</b>	Cadeia alfa do receptor para C3b
<b>CD18</b>	Cadeia $\beta$ do antígeno-1 associado à função dos linfócitos
<b>CD29</b>	Cadeia $\beta$ do antígeno de ativação muito tardia
<b>CD31</b>	Molécula 1 de adesão à célula endotelial e plaqueta
<b>CD38</b>	Enzima expressa em linfócitos B e T ativados
<b>CD40</b>	Receptor para o ligante do CD40
<b>CD49d</b>	Subunidade $\alpha_4$ do antígeno de ativação muito tardia 4
<b>CD49e</b>	Subunidade $\alpha_5$ do antígeno de ativação muito tardia 5
<b>CD54</b>	Molécula de adesão intercelular 1
<b>CD58</b>	Antígeno 3 associado a função dos linfócitos
<b>CD62L</b>	Ligante de selectina
<b>CD80</b>	Co-estimulador para ativação dos linfócitos T
<b>CD86</b>	Co-estimulador para ativação dos linfócitos T
<b>ConA</b>	Concanavalina A
<b>CPH I</b>	Complexo principal de histocompatibilidade tipo I
<b>ddl</b>	Didanosina
<b>d4T</b>	Estavudina
<b>EFV</b>	Efavirenz
<b>fMLP</b>	Peptídeos formilados
<b>G-CSF</b>	Fator estimulante de colônia de granulócitos
<b>HLA-DR</b>	Antígeno DR de leucócitos humanos
<b>ITRN</b>	Inibidor da transcriptase reversa nucleosídico
<b>ITRNN</b>	Inibidor da transcriptase reversa não nucleosídico
<b>IDV</b>	Indinavir
<b>I<math>\kappa</math>B<math>\alpha</math></b>	Inibidor kappa B alfa

<b>LPV</b>	Lopinavir
<b>MTT</b>	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio
<b>MCP-1</b>	Proteína 1 quimiotática de monócito
<b>MIP-1<math>\beta</math></b>	Proteína inflamatória beta de macrófago humano
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
<b>NBT</b>	Nitroblue tetrazolium
<b>NFV</b>	Nelfinavir
<b>PGF<sub>2</sub><math>\alpha</math></b>	Prostaglandina F <sub>2</sub> alfa
<b>PHA</b>	Fitohemaglutinina
<b>PMA</b>	Acetato miristato de forbol
<b>RTV</b>	Ritonavir
<b>RNS</b>	Espécies reativas de nitrogênio
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>rPMP</b>	Receptor para padrões moleculares de patógenos
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>SQV</b>	Saquinavir
<b>STF</b>	Salina tamponada com fosfato
<b>STZ</b>	Estreptozotocina
<b>SDF-1</b>	Fator 1 derivado das células do estroma
<b>TARV</b>	Terapia antiretroviral de alta eficácia
<b>VIH</b>	Vírus da Imunodeficiência Humana
<b>3TC</b>	Lamivudina

# RESUMO

A introdução da terapia antiretroviral de alta eficácia em 1996 determinou uma queda substancial da morbidade e mortalidade associadas ao Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH). Embora a infecção seja controlada pelos antiretrovirais, observam-se efeitos colaterais indesejados, fato que demonstra a capacidade de interação destes fármacos com as células dos indivíduos que os recebem. Recentemente, estes medicamentos têm sido relacionados à modulação do sistema imunitário inato e adaptativo, entretanto pouco se sabe acerca da influência dos protocolos rotineiramente utilizados pelos indivíduos infectados por este vírus, já que a maior parte das pesquisas investiga a influência de drogas isoladas sobre o sistema imunitário. Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar a influência, *in vitro*, da zidovudina (AZT), da lamivudina (3TC), do efavirenz (EFV) e do lopinavir/ritonavir (LPV/RTV) isoladamente ou das associações AZT/3TC/EFV e AZT/3TC/LPV/RTV sobre a capacidade fagocitária e produção de ânions superóxido por neutrófilos e monócitos de indivíduos saudáveis. Foram retirados 20 ml do sangue periférico de 20 voluntários, após consentimento informado, para realização dos ensaios e avaliadas tanto a capacidade fagocitária dos neutrófilos e monócitos pelos receptores para padrões moleculares de patógenos (rPMP) quanto pelos receptores para opsoninas. Os fármacos foram utilizados nas concentrações plasmáticas máximas observadas após ingestão, sendo para o AZT 1,64 µg/ml, para o 3TC 1,5µg/ml, para o EFV 3,7 µg/ml, para o LPV 11,45 µg/ml e para o RTV 2,86 µg/ml. O índice fagocitário foi determinado pela multiplicação da média de *Saccharomyces cerevisiae* aderidas/ingeridas por fagócito pelo percentual de fagócitos envolvidos na fagocitose. A avaliação da capacidade oxidativa dos fagócitos foi feita pelo teste do *nitroblue tetrazolium*. O EFV isoladamente aumentou o percentual de neutrófilos envolvidos na fagocitose pelos rPMP ( $p=0,004$ ) e para opsoninas ( $p=0,020$ ) enquanto que a pré-incubação com LPV/RTV ( $p=0,024$ ) e com a associação AZT/3TC/LPV/RTV ( $p=0,008$ ) por 60 minutos diminuiu o índice fagocitário dos neutrófilos quando avaliada a capacidade fagocitária destas células pelos rPMP. A pré-incubação dos fagócitos por 30 minutos com LPV/RTV aumentou a capacidade fagocitária dos monócitos pelos rPMP ( $p=0,003$ ) tanto pelo aumento da média de leveduras aderidas/ingeridas por monócito quanto pelo percentual de

monócitos envolvidos na fagocitose, resultado semelhante ao da pré-incubação dos monócitos com a associação AZT/3TC/LPV/RTV por 30 minutos e tendeu a aumentar o percentual de neutrófilos envolvidos na fagocitose ( $p=0,077$ ) quando avaliada a fagocitose por meio dos receptores para opsoninas. Entretanto, quando avaliada a influência do pré-tratamento dos monócitos com LPV/RTV por 60 minutos, a capacidade fagocitária destas células pelos rPMP diminuiu ( $p=0,013$ ) devido ao decréscimo do percentual de monócitos envolvidos na fagocitose. Estes fármacos isoladamente também diminuíram a capacidade fagocitária dos monócitos ( $p=0,020$ ) mediada por receptores para opsoninas pela diminuição da média de leveduras aderidas/ingeridas por monócito, enquanto que o AZT tendeu a aumentar a capacidade fagocitária destas células pelos receptores para padrões moleculares de patógenos ( $p=0,097$ ), pois tendeu a aumentar o percentual de monócitos envolvidos na fagocitose. A produção de radicais de oxigênio foi mais abrangentemente influenciada pelos antiretrovirais estudados. O AZT ( $p=0,027$ ) e o 3TC ( $p=0,004$ ) isoladamente e as associações LPV/RTV ( $p=0,0001$ ) e AZT/3TC/LPV/RTV ( $p=0,0001$ ) diminuíram a produção estimulada do ânion superóxido pelos fagócitos. O percentual de redução do NBT basal também foi deprimido pela associação LPV/RTV ( $p=0,0007$ ) e AZT/3TC/LPV/RTV ( $p<0,0001$ ) e tendeu a ser reduzido pelo 3TC isoladamente ( $p=0,071$ ). Os demais tratamentos não influenciaram a capacidade fagocitária ou a produção de ânions superóxido pelos fagócitos. Os resultados sugerem que o protocolo AZT/3TC/EFV, por não interferir com a capacidade fagocitária, seja mais adequado para o tratamento inicial dos indivíduos infectados pelo VIH enquanto que o protocolo contendo AZT/3TC/LPV/RTV, por sua propriedade imunomoduladora, deveria ser reservado para aqueles pacientes que apresentem intolerância ou resistência ao EFV. É possível também que pacientes com resistência a múltiplos esquemas antiretrovirais se beneficiem de protocolos que contenham LPV/RTV, pois como evidenciado diminuem a produção de radicais de oxigênio, podendo contribuir para taxas mais baixas de replicação do viral, de apoptose de linfócitos e da neurodegeneração relacionada ao VIH.

# **ABSTRACT**

The introduction of highly active antiretroviral therapy (HAART) in 1996 has decreased the morbidity and the mortality rates associated with the HIV infection. Though the infection can be controlled by antiretrovirals, these medicines may cause undesirable side effects due to their capacity to interact with cells of patients. It has been reported that these drugs may modulate the innate and adaptative immune system. However, few is known about the influences on immune functions by protocols routinely used in the treatment of HIV infected patients, constituted by reverse transcriptase and protease inhibitors, because most of researches have just investigated the influence restricted to isolated drugs. So, this work aimed to evaluate the influence of the isolate treatment with zidovudine (AZT), lamivudine (3TC), efavirenz (EFV), lopinavir/ritonavir (LPV/RTV) and of the associations AZT/3TC/EFV or AZT/3TC/LPV/RTV on phagocytic capacity and superoxide production by neutrophils and monocytes of healthy individuals, *in vitro*. It was collected 20 ml of peripheral blood from 20 healthy volunteers and the phagocytic capacity was assessed through pathogen-associated molecular patterns receptors (PAMP<sub>r</sub>) and through opsonin receptors. The drugs were used on maximum plasma levels considering pharmacokinetic studies after ingestion and the concentration applied for each one was 1,64 µg/ml for AZT, 1,5µg/ml for 3TC, 3,7 µg/ml for EFV and 11,45 µg/ml and 2,86 µg/ml for LPV and RTV, respectively. The phagocytic index was calculated as the average number of ingested *Saccharomyces cerevisiae* per phagocyte multiplied by the percentage of these cells engaged in phagocytosis. The oxidative capacity was assessed by the nitroblue tetrazolium (NBT) test. The isolated treatment with EFV increased the percentual of neutrophils engaged in phagocytosis through PAMP<sub>r</sub> (p=0,004) and through opsonin receptors (p=0,020), while the preincubation with LPV/RTV (p=0,024) and AZT/3TC/LPV/RTV (p=0,008) for 60 minutes decreased neutrophil phagocytic index when phagocytosis through PAMP<sub>r</sub> was investigated. The pretreatment of phagocytes for 30 minutes with LPV/RTV increased the monocyte phagocytic capacity through PAMP<sub>r</sub> (p=0,003) due to both the increase of the ingested yeasts average and the percentual of monocytes involved in phagocytosis, similar to the result observed to the pretreatment of these cells with AZT/3TC/LPV/RTV for 30 minutes and tended to increase (p=0,077) the percentual of neutrophils engaged in phagocytosis

through opsonin receptors. However, when LPV/RTV was incubated with monocytes for 60 minutes, the monocyte phagocytic index through PAMP<sub>r</sub> decreased ( $p=0,013$ ) due to the diminished percentual of monocytes engaged in phagocytosis. The LPV/RTV isolately decreased the monocyte phagocytic capacity ( $p=0,020$ ) due to the reduction of the number of ingested yeasts by these cells. The AZT tended to increase the monocyte phagocytic capacity when phagocytosis through PAMP<sub>r</sub> was analyzed ( $p=0,097$ ), because it tended to increase the percentual of monocytes engaged in phagocytosis. The production of reactive oxygen species (ROS) were more intensely influenced by the studied antiretrovirals. The AZT ( $p=0,027$ ) and the 3TC ( $p=0,004$ ) isolately and the associations LPV/RTV ( $p=0,0001$ ) and AZT/3TC/LPV/RTV ( $p=0,0001$ ) decreased the stimulated production of ROS by phagocytes. The percentual of baseline NBT reduction was also depressed by the associations LPV/RTV ( $p=0,0007$ ) e AZT/3TC/LPV/RTV ( $p<0,0001$ ) and tended to be reduced by the treatment with 3TC alone ( $p=0,071$ ). These results suggest that the protocol AZT/3TC/EFV can be more adequate to the initial treatment of those individuals infected by HIV because it has not changed the phagocytic capacity or ROS production by neutrophils and monocytes, while the association AZT/3TC/LPV/RTV could be more interesting to patients with intolerance or viral resistance to EFV. It is also possible that patients with multiple resistances to antiretrovirals can be benefited by protocols containing LPV/RTV, because the reduction of ROS determined by these drugs, as demonstrated in this research, can contribute for the lowest rates of viral replication, lymphocyte apoptosis and HIV-related neurodegeneration.

# INTRODUÇÃO

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida é ainda hoje responsável por 2,1 milhões de mortes anualmente (UM/WHO 2007), sendo ocasionada predominantemente pelo Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1 (VIH-1), um retrovírus pertencente à família lentivírus, que infecta várias células tais como linfócitos T CD4 e T CD8 ativados, macrófagos e células do sistema nervoso central. A replicação viral induz grave disfunção imunológica devido a alterações quantitativas e qualitativas dos linfócitos T CD4 e alterações qualitativas dos macrófagos que predis põem os infectados a infecções oportunistas e neoplasias, cujo controle é efetuado pela imunidade celular (Pantaleo e Fauci 1996; Paranjape 2005).

Com o advento da terapia antiretroviral de alta eficácia (TARV) em 1996, observou-se em muitos países uma queda substancial da morbidade e mortalidade associadas ao VIH (Richman 2001; Hoffman e cols. 2007).

Os protocolos considerados altamente eficazes contra este vírus combinam inibidores da transcriptase reversa nucleosídicos (ITRN) com inibidores da transcriptase reversa não nucleosídicos (ITRNN) ou inibidores da protease (IP). Os ITRN são análogos de nucleosídeos que funcionam como terminadores de cadeia que inibem a síntese do DNA pró-viral. Já os ITRNN se ligam próximos ao domínio catalítico da transcriptase reversa e bloqueiam a função desta enzima enquanto que os IP impedem a síntese de partículas virais maduras por inibirem a enzima protease, responsável pela geração da transcriptase reversa, integrase, protease e proteínas estruturais a partir do polipeptídeo gag-pol (Richman 2001; Goodman e cols. 2003; Hoffman e cols. 2007).

Os pacientes que respondem ao tratamento anti-VIH apresentam diminuição acentuada da carga viral a níveis abaixo do limite de detecção (50 ou 80 cópias/ml) e aumento da contagem de linfócitos T CD4 (Ministério da Saúde 2007; Hoffman e cols. 2007). Tanto as eficácias virológica quanto imunológica associadas ao uso da TARV podem perdurar por anos (Richman 2001; Hoffman e cols. 2007).

Embora a infecção pelo VIH seja controlada pelos antiretrovirais, observam-se efeitos colaterais indesejados com o tratamento. Alguns são menores e tratados sintomaticamente enquanto outros podem ocasionar o óbito. Os mais comumente mencionados na literatura mundial são vômito, diarreia, insônia, fadiga, agitação, sonhos bizarros, estomatite, cefaléia, escurecimento das unhas, lipodistrofia, reações de hipersensibilidade leves a acentuadas, osteopenia/osteoporose, cardiomiopatia, anemia, neutropenia, dislipidemia, resistência insulínica/hiperglicemia, acidose láctica, pancreatite, esteatose hepática e neuropatia periférica (Brinkman e cols. 1998; Marzolini e cols. 2001, Serghides e cols. 2001; Delsite e cols. 2003; Dressman e cols. 2003; Goodman 2003; Anderson e cols. 2004; Ministério da Saúde 2007; Bradshaw e cols. 2006; Hoffman e cols. 2007). O fato de existirem efeitos colaterais demonstra que estes medicamentos interagem com as células dos indivíduos que os recebem.

Os fagócitos são células especializadas que realizam funções essenciais para uma adequada resposta imunitária tais como fagocitose, morte microbiana, apresentação de antígenos, indução da proliferação e diferenciação de subpopulações de linfócitos T CD4 e T CD8, secreção de citocinas e substâncias quimiotáticas (Pettit e Fay 1998; Carréno e cols. 2002;

Greenberg e Grinstein 2002; Abbas e Lichtman 2005; Jutras e Desjardins 2005). Tem sido sugerido em alguns modelos experimentais que os antiretrovirais podem modular as funções destas células, embora com resultados ainda controversos. Macrófagos tratados com indinavir (IDV) apresentaram capacidade fagocitária diminuída para eritrócitos parasitados por *Plasmodium falciparum* por uma diminuição na expressão de CD36 (Nathoo e cols. 2003). Blasi e cols. (2004) demonstraram que a capacidade fagocitária e microbida de micróglia para o patógeno oportunista *Cryptococcus neoformans* aumentou após exposição ao IDV. Além disso, Azzam e cols. (2006) relataram que macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico expostos a estavudina (d4T), didanosina (ddI) e zidovudina/lamivudina (AZT/3TC) apresentaram diminuição da capacidade fagocitária para eritrócitos de ovelha opsonizados. Estes mesmos pesquisadores demonstraram que o IDV, nas concentrações de 10 a 100  $\mu\text{mol/L}$  (de 7,12 a 71,2  $\mu\text{g/ml}$ ), reverteu o decréscimo da capacidade fagocitária induzida pelo AZT/3TC, mas não pelo ddI/d4T e que este medicamento isoladamente foi capaz de estimular a capacidade fagocitária de macrófagos derivados de monócitos de indivíduos normais, porém foi incapaz de estimular a fagocitose destas células quando infectadas pelo VIH. Já foi demonstrado também que os antiretrovirais saquinavir (SQV), lopinavir (LPV), ritonavir (RTV), nelfinavir (NFV) e amprenavir (APV) diminuem a capacidade fagocitária para zimosan opsonizado por neutrófilos do sangue periférico de indivíduos saudáveis (Hadad e cols. 2007).

A influência dos antiretrovirais sobre a capacidade microbida dos fagócitos também foi explorada. Antonelli e cols. (1997) relataram que houve diminuição da morte intracelular de *Candida albicans* após o tratamento de

macrófagos derivados de monócitos com zalcitabina. Resultados semelhantes foram encontrados por Roilides e cols. (1990) que demonstraram que o análogo de nucleosídeo estavudina (d4T), em níveis terapêuticos e em concentrações mais elevadas, aumentou a morte intracelular de *Candida albicans* e a capacidade bactericida para *Staphylococcus aureus* dos polimorfonucleares de indivíduos normais. Mostraram também que a morte intracelular de *Candida albicans* foi acentuada pela desoxicidina (ddC). Os antiretrovirais também foram relacionados à produção acentuada ou suprimida de moléculas microbicidas. Pesquisas realizadas por Hadad e cols. (2007) demonstraram que a produção de ânion superóxido ( $O_2^-$ ) por neutrófilos diminuiu de modo dose dependente após exposição aos antiretrovirais SQV, LPV, RTV, NFV e APV. Já Komarov e cols. (2004) encontraram produção aumentada de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) utilizando macrófagos peritoneais de ratos Sprague Dawly incubados com AZT e estimulados por partículas de látex. Até mesmo a migração de fagócitos foi influenciada pelos antiretrovirais, pois Hadad e cols. (2007) demonstraram que o tratamento de neutrófilos com SQV, LPV, RTV, NFV e APV diminuiu a capacidade quimiotática de neutrófilos para peptídeos formilados (fMLP).

Além da modulação das funções fagocitárias já citadas para os inibidores da protease, Gruber e cols. (2001) demonstraram que o IDV, SQV, RTV e NFV alteraram a expressão das moléculas CD40, CD86 e CD80 em células dendríticas derivadas de monócitos e determinaram, com exceção do NFV, uma diminuição da capacidade destas células estimularem uma reação mista de leucócitos.

Linfócitos, células que desempenham diversos papéis na defesa do organismo e alvos do VIH, também podem ser afetados pelos antiretrovirais. Chavan e cols. (2001) descreveram que células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), provenientes de crianças infectadas pelo VIH e de voluntários saudáveis tratados com IDV, apresentaram resposta proliferativa diminuída aos estímulos com fitohemaglutinina (PHA), acetato miristato de forbol (PMA), concanavalina A (Con A) e anticorpo monoclonal anti-CD3. Além disso, Francke e cols. (2000; 2002) demonstraram que a expansão clonal de linfócitos T citotóxicos pode ficar comprometida pela exposição ao AZT, particularmente a proliferação de linfócitos T citotóxicos virgens e os de memória privados do contato com o antígeno. Resposta proliferativa comprometida pelos antiretrovirais também foi relatada por Beq e cols. (2005), pois mostraram que na presença do AZT e do SQV, linfócitos T CD4 e T CD8 de indivíduos saudáveis e infectados pelo VIH apresentaram decréscimo da proliferação estimulada pela IL-7 que foi acompanhada da depressão da expressão do receptor para esta citocina em linfócitos T CD8.

Alguns antiretrovirais podem não afetar diretamente os linfócitos T citotóxicos, mas podem impedir que sejam adequadamente ativados, como comprovado por Groettrup e cols. (1998), que demonstraram por ensaios *in vivo* e *in vitro* que o ritonavir acarreta um decréscimo da apresentação de antígeno pelo complexo principal de histocompatibilidade tipo I (CPH I) e da degradação do inibidor kappa B ( $I\kappa B\alpha$ ) por ser um inibidor do proteasoma. Posteriormente, Groettrup e cols. (1999) caracterizaram que a inibição observada foi específica para as subunidades MB-1 (X) e LMP7.

Tem sido sugerido ainda que os antiretrovirais podem comprometer a viabilidade dos linfócitos, pois Groettrup e cols. (1999) demonstraram que o ritonavir em concentrações terapêuticas (5 $\mu$ M ou 3,61  $\mu$ g/ml) ou superiores, diminuiu a viabilidade e a taxa de proliferação linfocitária. Além disso, dados provenientes de pacientes infectados pelo VIH indicam que indivíduos tratados com antiretrovirais, principalmente pela didanosina (ddI), exibem linfócitos com maior decréscimo do potencial de membrana mitocondrial, que é um indicador de toxicidade, do que pacientes não tratados. Este fato se correlacionou negativamente com contagem de linfócitos T CD4 abaixo de 200 células por microlitro, sugerindo que a terapia antiretroviral possa ter um papel importante na depressão do sistema imunitário apresentada por estes pacientes (Polo e cols. 2003).

Apoptose é um mecanismo de morte celular envolvido em vários processos biológicos, tais como crescimento e desenvolvimento, renovação celular e remodelação tecidual e é a chave para regulação da resposta imunitária celular e humoral (Pitrack 1997; Hengartner 2000). No entanto, na infecção pelo VIH é um dos mecanismos que contribui para a perda progressiva de linfócitos T CD4 (Vlahakis e cols. 2007) e de neutrófilos (Pitrak e cols. 1996; Pitrack 1997). Algumas pesquisas têm apontado propriedades anti-apoptóticas para alguns antiretrovirais. Foi demonstrado por Matarrese e cols. (2003) que linfócitos T ativados por fitohemaglutinina (PHA) e IL-2 e expostos ao LPV, SQV e IDV apresentaram taxas de apoptose significativamente menores que os controles. Esses investigadores também mostraram que esses fármacos inibem a apoptose de linfócitos T mediada pelo Fas, radiação ultravioleta B e fator de necrose tumoral alfa (FNT- $\alpha$ ). Linfócitos T provenientes

de crianças infectadas pelo VIH também apresentaram uma taxa menor de apoptose por ativação quando estavam em um regime terapêutico contendo inibidores da protease (Chavan e cols. 2001). Experimentos *in vitro* conduzidos por Hadad e cols. (2007) demonstraram que neutrófilos provenientes de indivíduos saudáveis tratados com SQV, LPV, RTV, NFV e APV apresentaram um decréscimo da taxa de apoptose espontânea associado à inibição da  $\mu$ -calpaína. Resultados semelhantes utilizando os antiretrovirais RTV e IDV foram encontrados por Mastroianni e cols. (2000). Ainda neste trabalho relataram que um grupo de indivíduos infectados pelo VIH em tratamento com regimes contendo NFV, RTV e IDV durante 110 semanas se beneficiaram do uso destes medicamentos mesmo mantendo viremia elevada, pois apresentaram redução da apoptose e aumento da capacidade quimiotática de neutrófilos, sugerindo efeito direto dos inibidores da protease nas vias apoptóticas que foram independentes da inibição da replicação viral. Entretanto, certos antiretrovirais podem apresentar um papel pró-apoptótico. O AZT adicionado a culturas de linfócitos T ocasionou um aumento do percentual de células apoptóticas acompanhado da despolarização mitocondrial. Este aumento foi evidenciado tanto em culturas de linfócitos não estimulados quanto estimulados por anticorpo monoclonal anti-Fas e foi revertido pela incubação prévia com IDV, SQV e LPV (Matarrese e cols. 2003).

Os protocolos indicados pelo Ministério da Saúde Brasileiro para o tratamento da infecção pelo VIH de pacientes adultos e adolescentes virgens de tratamento são a zidovudina e lamivudina associada ao efavirenz ou ao lopinavir/ritonavir. A associação com efavirenz é a primeira escolha em função da menor toxicidade e maior potencial de adesão (Ministério da Saúde 2007).

Estes medicamentos apresentam propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas distintas.

A zidovudina e a lamivudina são análogos dos nucleosídeos timidina e citidina, respectivamente. São absorvidas pelo trato gastrointestinal e distribuídas rapidamente via sangue pelos vários sistemas orgânicos. Penetram nas células e são convertidos por cinases celulares para a forma ativa trifosfatada que é então incorporada ao DNA pró-viral. O AZT sofre biotransformação hepática através da glicuronização e é eliminado pelos rins tanto em sua forma original quanto na forma do metabólito GAZT (3'-deoxi-5'-O-β-D-glicupiranuronosil-timidina). O 3TC é eliminado predominantemente inalterado pelos rins (Goodman e cols. 2003; Brinkman e cols. 1998).

O efavirenz é um inibidor da transcriptase reversa não nucleosídico absorvido pelo trato gastrointestinal, transportado por via sanguínea nas formas livre e conjugada às proteínas plasmáticas, principalmente a albumina, é inativado por hidroxilação feita pelas enzimas do sistema citocromo P450 e eliminado pela urina (Goodman e cols. 2003; Smith e cols. 2005).

O lopinavir e o ritonavir são inibidores da protease viral que são absorvidos pelo trato gastrointestinal, transportados pelo sangue ligados às proteínas plasmáticas, metabolizados pelo sistema citocromo P450 e eliminados tanto nas formas ativa quanto metabolizada pelas fezes e urina. O ritonavir tem sido coformulado com o lopinavir, pois como é um inibidor da enzima citocromo P450 3A4, retarda a metabolização do lopinavir (Richman 2001; Goodman e cols. 2003; Isaac e cols. 2004).

Desconhece-se a eficácia em longo prazo de esquemas compostos por inibidores da transcriptase reversa nucleosídicos com não nucleosídicos ou

inibidores da protease. Estudo realizado por Staszewski e cols. (1999) mostrou que pacientes tratados com AZT, 3TC e EFV apresentaram supressão viral abaixo do limite de detecção e elevação da contagem de linfócitos T CD4 mais acentuadas do que os que receberam AZT, 3TC e IDV. Coortes realizadas por Manfredi e cols. (2004) e por Torti e cols. (2005) sugerem que protocolos contendo efavirenz acarretam uma supressão virológica comparável aos regimes contendo lopinavir/ritonavir, porém a recuperação imunológica parece ser favorecida por regimes contendo lopinavir/ritonavir.

Embora existam alguns estudos sobre a modulação do sistema imunitário pelos antiretrovirais, não existem dados disponíveis sobre os efeitos do EFV ou dos protocolos AZT, 3TC com EFV ou LPV/RTV sobre este sistema.

Alguns investigadores têm demonstrado que a infecção pelo VIH pode comprometer de modo variável as funções fagocitárias. Já se relatou diminuição da capacidade fagocitária de monócitos/macrófagos provenientes de indivíduos infectados pelo VIH para *Toxoplasma gondii* (Biggs e cols. 1995), *Mycobacterium avium* (Pugliese e cols. 2005), *Cryptococcus neoformans* (Pugliese e cols. 2005), *Histoplasma capsulatum* (Chaturvedi e cols. 1997), *Pneumocystis carinii* (Koziel e cols. 1998) e de neutrófilos para *Candida albicans* (Crowe e cols. 1994), *Staphylococcus aureus* (Beck 2005) e *Escherichia coli* (Pugliese e cols. 2005). Por outro lado se descreveu fagocitose e atividade fungistática aumentadas de macrófagos alveolares obtidos por lavado broncoalveolar para *Staphylococcus aureus* e *Cryptococcus neoformans*, respectivamente (Beck 2005) e aumento da capacidade fagocitária de polimorfonucleares para *Escherichia coli* (Shalekoff e cols. 1998). Têm sido observados também dados conflitantes sobre a produção de

intermediários reativos de oxigênio (ROS), que são potentes moléculas oxidantes utilizadas pelos fagócitos para realizar a morte microbiana, pois já se relatou baixa (Muñoz e cols. 1999; Dios e cols. 2000) ou alta (Elbim e cols. 1994; Elbim e cols. 1999; Hulgán e cols. 2003) produção destas moléculas. Tem sido sugerido ainda que nos estágios finais da infecção pelo VIH há um decréscimo da quimiotaxia de monócitos, pois se encontrou monócitos de pacientes no estágio A expressando níveis elevados de CD49d e CD11a/CD18 e nos estágios B e C níveis baixos de CD49e, CD62L, CD11a/CD18, CD29, CD31, CD54 e CD58 (Pugliese e cols. 2005). A capacidade de macrófagos estimularem uma resposta antiviral apropriada pode estar alterada, pois Clerici e cols. (1995) demonstraram que células mononucleares do sangue periférico de indivíduos assintomáticos ou sintomáticos apresentaram aumento da produção IL-10, potente depressora da resposta T auxiliar 1, responsável pelo controle da infecção pelo VIH. Decréscimo da concentração do fator estimulante de colônia de granulócitos (G-CSF) foi demonstrado em indivíduos infectados pelo VIH e este fato tem sido associado à diminuição quantitativa e qualitativa dos neutrófilos (Kuritzkes, 2000).

Pelo exposto, conclui-se que devido ao fato de os indivíduos infectados pelo VIH apresentarem função fagocitária comprometida, de existirem evidências de que os antiretrovirais são capazes de modular as respostas destas células e de não existirem dados disponíveis sobre a influência dos protocolos atualmente empregados para pacientes virgens de tratamento, conhecer como essas drogas interagem com monócitos e neutrófilos torna-se indispensável para propiciar um acompanhamento mais adequado destes pacientes.

# **OBJETIVOS**

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência *in vitro* dos antiretrovirais zidovudina, lamivudina, efavirenz e lopinavir/ritonavir isoladamente e das associações da zidovudina e lamivudina com o efavirenz ou com o lopinavir/ritonavir sobre as funções dos fagócitos de indivíduos normais.

### **Objetivos específicos**

1. Avaliação da influência *in vitro* destes fármacos sobre a capacidade fagocitária de monócitos e neutrófilos pelos receptores para padrões moleculares de patógenos.

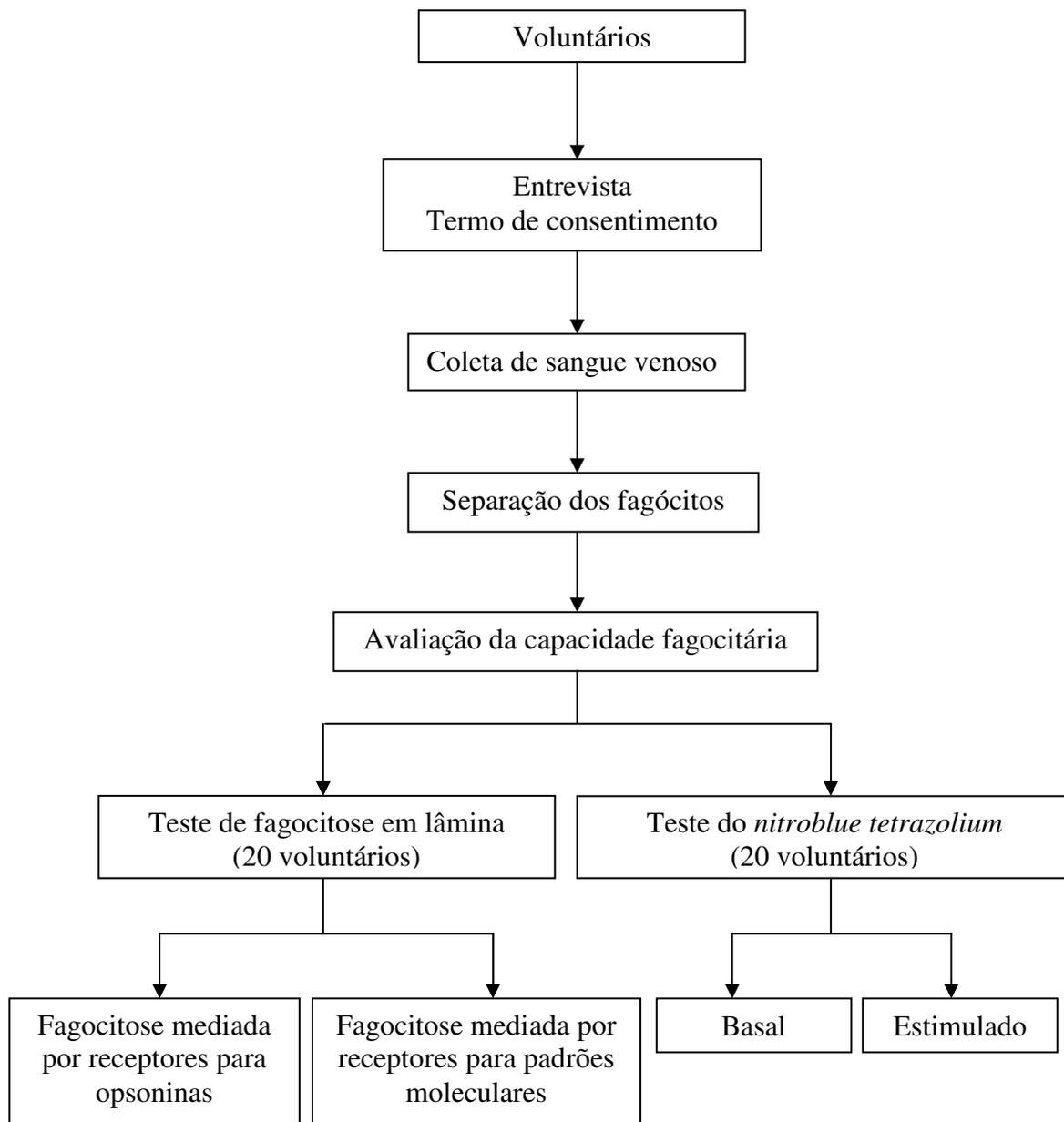
2. Avaliação da influência *in vitro* destes fármacos sobre a capacidade fagocitária de monócitos e neutrófilos pelos receptores para opsoninas.

3. Avaliação da influência *in vitro* destes fármacos sobre a produção de radicais de oxigênio.

# **MATERIAL E MÉTODOS**

### 3.1- Delineamento experimental

Neste estudo foi avaliada a influência *in vitro* dos antiretrovirais zidovudina, lamivudina, efavirenz e lopinavir/ritonavir isoladamente e das associações da zidovudina e lamivudina com o efavirenz ou com o lopinavir/ritonavir sobre capacidade funcional dos fagócitos de indivíduos saudáveis. As influências destes fármacos sobre os fagócitos foram investigadas por meio da avaliação da capacidade fagocitária de neutrófilos e monócitos mediada por receptores para padrões moleculares de patógenos ou para opsoninas e sobre o metabolismo oxidativo pelo teste do *nitroblue tetrazolium* (NBT). O diagrama geral do estudo encontra-se descrito na **Figura 1**.



**Figura 1. Delineamento experimental**

### 3.2 - Grupos de estudo e aspectos éticos

Este estudo foi realizado no laboratório de Imunologia Celular da Área de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

Durante todo o desenvolvimento do trabalho, as normas éticas para pesquisa científica em seres humanos estabelecidas pela Declaração Helsinki (WHO, 2001) e pelo Ministério da Saúde Brasileiro, resolução 196/96 (CNS, 1996) foram rigorosamente observadas.

O projeto de pesquisa, enquadrado dentro do grupo de risco mínimo, foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. O parecer do comitê de ética encontra-se no **Anexo 1**.

Foram selecionados para participar desta pesquisa 20 indivíduos saudáveis para os testes de fagocitose, sendo 10 do sexo masculino e 10 do sexo feminino, com média  $\pm$  DP de idade de  $30,7 \pm 8,3$  anos (**Tabela 1**) e 20 indivíduos saudáveis para os testes do NBT, sendo 10 do sexo masculino e 10 do sexo feminino com média  $\pm$  DP de idade de  $26,2 \pm 7,4$  anos (**Tabela 2**), variando entre 18 e 50 anos.

Foram excluídos do estudo idosos, indivíduos que estivessem utilizando medicamentos ou com doenças pré-existentes que pudessem influenciar o sistema imunitário, tais como *Diabetes mellitus*, tabagismo e alcoolismo.

A coleta do sangue só foi feita após os voluntários estarem cientes dos objetivos da pesquisa e dos procedimentos a serem realizados e após assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido apresentado no **Anexo 2**.

Cada voluntário doou 20 ml de sangue que foi coletado com vacutainer sem anticoagulante e heparinizado, com agulha de coleta múltipla, da região da fossa cubital, com material estéril e descartável, após anti-sepsia com álcool iodado. A amostra foi utilizada para análise das funções dos fagócitos *in vitro* tratados ou não com zidovudina, lamivudina, efavirenz e lopinavir/ritonavir isoladamente ou nas combinações acima mencionadas.

Este trabalho foi elaborado e desenvolvido com total isenção de quaisquer conflitos de interesse.

As drogas utilizadas foram gentilmente cedidas pelo Programa Nacional de DST e AIDS do Ministério da Saúde Brasileiro.

**Tabela 1. Características antropométricas dos indivíduos cujas amostras sanguíneas foram analisadas para capacidade fagocitária**

<b>Nº.</b>	<b>Idade (anos)</b>	<b>Sexo</b>	<b>Peso (Kg)</b>	<b>Altura (m)</b>	<b>IMC</b>
1	22	M	72,0	1,72	24,3
2	35	M	74,5	1,60	29,1
3	33	M	62,5	1,71	21,4
4	34	F	60,0	1,70	20,8
5	28	M	88,5	1,74	29,2
6	22	F	61,0	1,70	21,1
7	37	M	59,0	1,73	19,7
8	48	M	69,0	1,69	24,1
9	30	F	45,0	1,59	17,7
10	22	F	60,0	1,73	20,1
11	23	M	76,0	1,80	23,5
12	29	M	68,0	1,74	22,5
13	31	F	65,0	1,60	25,3
14	37	F	53,5	1,56	21,9
15	20	F	43,5	1,60	16,9
16	18	M	57,5	1,69	20,1
17	43	F	53,0	1,52	22,9
18	28	F	87,0	1,62	33,2
19	31	M	70,0	1,73	23,4
20	43	F	65,0	1,64	24,1
<b>MD ± DP = 30,7 ± 8,3</b>		<b>10 F/10 M</b>			

M - Masculino; F - Feminino; MD - Média de idade; IMC - Índice de massa corporal

**Tabela 2. Características antropométricas dos indivíduos cujas amostras sanguíneas foram analisadas para produção de radicais de oxigênio**

<b>Nº.</b>	<b>Idade (anos)</b>	<b>Sexo</b>	<b>Peso (Kg)</b>	<b>Altura (m)</b>	<b>IMC</b>
1	48	M	69,0	1,69	24,2
2	33	M	62,5	1,71	21,3
3	37	M	59,0	1,73	19,7
4	27	F	86,0	1,60	33,6
5	31	F	65,0	1,60	25,4
6	22	F	61,0	1,70	21,1
7	30	F	52,0	1,60	20,3
8	34	F	60,0	1,70	20,8
9	23	F	49,5	1,58	19,8
10	22	M	72,0	1,72	24,3
11	22	F	51,0	1,67	18,3
12	18	M	69,5	1,84	20,5
13	22	F	60,0	1,73	20,0
14	25	F	55,0	1,52	23,8
15	26	M	80,0	1,78	25,2
16	19	F	54,0	1,63	20,3
17	21	M	78,0	1,80	24,1
18	22	M	80,0	1,80	24,6
19	23	M	81,5	1,75	26,6
20	19	M	63,0	1,87	18,0
MD ± DP = 26,2 ± 7,4		10 F/10 M			

M - Masculino; F - Feminino; MD - Média de idade; IMC - Índice de massa corporal

### **3.3 - Concentrações dos antiretrovirais utilizadas nos experimentos *in vitro***

Os fagócitos foram pré-tratados com 1,64 µg/ml de zidovudina (Cristália) por 30 e 60 minutos. A escolha desta concentração baseou-se em estudo farmacocinético da droga efetuado em seres humanos, no qual se determinou que após a ingestão de 300 mg de ZDV ocorre em média um pico sérico de 1,64 µg/ml em 32 minutos, que permanece por aproximadamente 30 minutos (Wang e cols. 1999).

Com relação à lamivudina (Biomanguinhos), os fagócitos foram pré-incubados com 1,50 µg/ml deste medicamento por 30 ou 60 minutos. Esta concentração foi escolhida, pois corresponde ao pico sérico observado após 53 minutos da ingestão de 150 mg de 3TC e permanece por aproximadamente 30 minutos (Wang e cols. 1999)

Já para o efavirenz (Merck Sharp & Dohme), os fagócitos foram pré-incubados com 3,7 µg/ml do medicamento por 30 minutos, concentração que corresponde ao pico sérico médio observado após 4 a 5 horas e que permanece por 30 minutos após a ingestão de 600 mg deste fármaco (Smith e cols. 2005).

Os fagócitos foram pré-tratados com 11,446 µg/ml de lopinavir (Abbott) e 2,8615 µg/ml de ritonavir (Abbott) por 30 e 60 minutos. Pelo fato do medicamento disponível para os experimentos ter sido uma associação das duas drogas mencionadas, as concentrações utilizadas foram ajustadas em função dos parâmetros farmacocinéticos do lopinavir. Verificaram que após a ingestão de 400 mg/100 mg de LPV/RTV ocorre um pico sérico do LPV que

varia de 8,179 a 17,407 µg/ml com uma mediana de 11,446 µg/ml em 1,5 a 4 horas, que permanece por aproximadamente 1 hora (Isaac e cols. 2004)

### **3.4 - Avaliação da influência das drogas antiretrovirais sobre a fagocitose efetuada por neutrófilos e monócitos pelos receptores para padrões moleculares de patógenos**

A influência dos antiretrovirais sobre a capacidade fagocitária de neutrófilos e monócitos foi avaliada pelo teste de fagocitose em lâmina adaptado de técnica previamente descrita (Muniz-Junqueira e cols. 2003).

Do sangue venoso coletado em vacutainer estéril sem anticoagulante, 40 µl foram depositados em escavações de 7 mm de diâmetro, delimitadas com resina epóxi, em lâmina de microscopia óptica e incubadas a 37°C, em câmara úmida, por 45 minutos, para permitir aderência dos fagócitos à lâmina. Decorrido este período, as lâminas foram lavadas com salina tamponada com fosfato (STF), pH 7,2, a 37°C para remoção das células não aderentes tais como linfócitos, hemácias e plaquetas. As células aderidas às escavações foram pré-incubadas ou não com as drogas isoladas ou associadas nas concentrações acima descritas, diluídas em Hanks-Triz (Gibco) e soro fetal bovino (SFB) (Gibco) a 10% em câmara úmida, a 37°C, durante 30 minutos. Nesta etapa, outras lâminas tratadas com zidovudina, lamivudina ou lopinavir/ritonavir foram pré-incubadas também por 60 minutos, antes da realização do teste de fagocitose. Terminado o tempo de incubação, as lâminas foram lavadas e adicionavam-se  $2,5 \times 10^5$  *Saccharomyces cerevisiae* por escavação diluídas em Hanks-Triz e SFB, contendo ou não as mesmas

concentrações das drogas e permaneceram em câmara úmida, por 30 minutos e a 37°C. As lâminas foram novamente lavadas com STF, pH 7,2, a 37°C para remoção das leveduras não aderidas ou fagocitadas e posteriormente com Hanks-Triz contendo 30% de SFB para preservar as preparações, que foram secas com vento quente, fixadas com metanol absoluto (Vetec) por 1 minuto e coradas com Giemsa (Dinâmica) a 10% em tampão para coloração, pH 7,2 por 10 minutos.

Os fagócitos foram analisados em microscópio óptico em objetiva de imersão, sendo contados 200 monócitos e 200 neutrófilos por área de preparação para determinação do índice fagocitário.

O índice fagocitário foi determinado pela multiplicação da média de *Saccharomyces cerevisiae* aderidas/ingeridas por fagócito pelo percentual de fagócitos envolvidos na fagocitose (Muniz-Junqueira e cols. 2003). Foi feita análise individualizada para neutrófilos e monócitos.

Índice fagocitário = média de leveduras ingeridas/aderidas por fagócitos x percentual de fagócitos envolvidos na fagocitose.

### **3.5 - Avaliação da influência das drogas antiretrovirais sobre a fagocitose efetuada por neutrófilos e monócitos pelos receptores para opsoninas**

Para avaliar a influência dos antiretrovirais sobre a capacidade fagocitária de monócitos e neutrófilos pelos receptores para opsoninas, como os componentes do sistema complemento e IgG, foi realizado o teste de fagocitose na presença de plasma humano fresco, proveniente do próprio

doador, como fonte de opsoninas. Estas se adsorvem a superfície das leveduras facilitando a fagocitose.

A técnica de fagocitose foi realizada como acima descrito, entretanto as leveduras foram previamente incubadas com plasma fresco do próprio indivíduo estudado.

### **3.6 - Preparo da suspensão estoque de *Saccharomyces cerevisiae* para o teste de fagocitose**

Um tablete de 50 gramas de fermento para pão fresco (Fleishmann) foi dissolvido em 220 ml de STF, pH 7,2 e autoclavado a 121°C em uma atmosfera, por 30 minutos e em seguida a suspensão foi lavada várias vezes por centrifugação com STF, pH 7,2 até obter-se um sobrenadante límpido. O sedimento foi suspenso em 28 ml de STF, pH 7,2, contendo 0,1 M de 2-mercaptoetanol e incubado a 37°C por 2 horas em agitação. A suspensão foi lavada 3 vezes por centrifugação para retirada do 2-mercaptoetanol e suspensa em 55 ml de solução de 0,02 M de iodo acetamida em STF, pH 7,2. Fez-se nova incubação por 2 horas à temperatura ambiente e com agitação e em seguida as leveduras foram lavadas 3 vezes por centrifugação em STF, suspensas em 220 ml de STF e o pH acertado para 7,2. A preparação foi novamente autoclavada a 121°C, por 30 minutos, lavada por centrifugação em STF até o sobrenadante tornar-se límpido e suspensa em 110 ml de tampão veronal, pH 7,2, contendo 200 mg/L de azida sódica, como preservativo. Após a preparação as leveduras foram mantidas a 4°C e obtidas do estoque para utilização em cada experimento (Lachman e Hobart 1978).

Esta técnica acarreta uma modificação na superfície das leveduras e permite a adsorção do componente C3 do complemento e de anticorpos presentes no soro (Brandi 1993; Campbell e Douglas 1997).

### **3.7 - Preparo das leveduras para uso no teste de fagocitose**

Para cada experimento, uma alíquota de 100 µl era retirada da suspensão estoque e o volume completado para 1 ml com STF, pH 7,2 e a suspensão lavada três vezes por centrifugação. Após a última centrifugação, as leveduras eram quantificadas em câmara de Neubauer e em seguida incubadas com SFB (Gibco) ou plasma humano fresco a 10% em Hanks-Triz (Gibco) caso fossem destinadas aos testes de fagocitose por meio dos receptores para padrões moleculares de patógenos ou para opsoninas, respectivamente.

### **3.8 - Avaliação da influência dos antiretrovirais sobre a produção de radicais de oxigênio por fagócitos pelo teste do *nitroblue tetrazolium* (NBT)**

Para analisar a influência dos antiretrovirais sobre a produção de radicais de oxigênio pelos fagócitos de indivíduos normais foi feito o teste do NBT. Neste teste pode-se detectar indiretamente a produção do ânion superóxido (Nydegger 1973). O processo de redução do corante pelo ânion superóxido converte o NBT de um composto amarelo e solúvel em um material insolúvel de coloração azul, visível no citoplasma do fagócito. A proporção de células

que reduzem o NBT tem relação direta com a produção de radicais de oxigênio (Brandi 1993; Campbell e Douglas 1997).

Foi coletado sangue venoso em vacutainer estéril heparinizado. O sangue total foi homogeneizado ou não com os antiretrovirais previamente diluídos com Hanks-Triz (Gibco) de modo que cada ml contivesse as concentrações acima descritas. Foram então depositados 40 µl desta suspensão nas escavações de 7 mm de diâmetro e as preparações foram incubadas a 37°C, em câmara úmida, por 45 minutos, para permitir aderência dos fagócitos à lâmina. Decorrido este período, as lâminas foram lavadas com STF, pH 7,2, a 37°C para remoção das células não aderentes. As células aderidas foram então incubadas com uma solução de NBT (Sigma) a 0,005% em Hanks-Triz (Gibco) contendo ou não os antiretrovirais nas concentrações acima descritas (NBT basal). Para avaliação da produção de radicais de oxigênio após estímulo, foi acrescentado ao teste acima  $2,5 \times 10^5$  leveduras sensibilizadas com plasma humano. As preparações foram novamente incubadas em câmara úmida, a 37°C, durante 20 minutos. A seguir as lâminas foram lavadas com STF, pH 7,2, a 37°C e com Hanks-Triz contendo 30% de SFB como última solução de lavagem. As preparações foram secas com vento quente, fixadas com metanol absoluto (Vetec) por 1 minuto e contra-coradas com safranina a 0,05% (Reagen) por 5 minutos, para permitir a visualização dos núcleos dos fagócitos.

As preparações foram examinadas ao microscópio óptico, em objetiva de imersão, sendo determinado o percentual de redução do NBT em 200 fagócitos por preparação.

### **3.9 - Análise estatística:**

As análises estatísticas foram realizadas empregando-se o software Prism® (Graphpad, USA, 2005).

Para a aplicação dos testes estatísticos verificou-se previamente a normalidade ou não das variáveis nas amostras. Para comparação entre duas variáveis com distribuição normal foi utilizado o teste t pareado e para aquelas que não apresentaram distribuição normal foi utilizado o teste de Wilcoxon. Para comparação entre mais do que duas variáveis com distribuição normal foi utilizado o teste de ANOVA seguido do método de Student-Newman-Keuls. Para amostras com distribuição não normal foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo método de Dunn.

As diferenças entre as variáveis comparadas foram consideradas estatisticamente significativas quando a probabilidade bi-caudal da sua ocorrência devida ao acaso (erro tipo I) foi menor que 5% ( $p < 0,05$ ).

Os dados foram expressos graficamente como média e desvio padrão para as amostras com distribuição normal e como mediana, quartis e extremos para aquelas com distribuição não normal excetuando-se os gráficos das figuras 10, 12, 13, 14, 23, 27, 28 e 36 que foram expressos como mediana, quartis e extremos, para homogeneização dos resultados.

# **RESULTADOS**

#### **4.1 - Influência do tratamento de fagócitos de indivíduos normais com zidovudina, lamivudina, efavirenz ou lopinavir/ritonavir isoladamente ou associados sobre a capacidade fagocitária**

A influência do tratamento *in vitro* de fagócitos de indivíduos normais com os antiretrovirais zidovudina, lamivudina, efavirenz ou lopinavir/ritonavir isolados ou associados sobre a capacidade fagocitária dos neutrófilos e dos monócitos foi investigada pelo teste de fagocitose em lâmina.

Avaliou-se a fagocitose por meio de dois tipos de receptores: a mediada por receptores para padrões moleculares de patógenos, quando as leveduras foram incubadas com soro fetal bovino inativado, e a mediada por receptores para opsoninas, quando as leveduras foram incubadas com plasma fresco do doador.

A capacidade fagocitária foi expressa por meio do índice fagocitário, da média de leveduras ingeridas/aderidas por fagócito e do percentual de fagócitos envolvidos na fagocitose.

#### 4.1.1 - Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos de indivíduos normais com efavirenz sobre a fagocitose pelos receptores para padrões moleculares de patógenos

O tratamento dos fagócitos com o efavirenz por 30 minutos aumentou a mediana do índice fagocitário dos neutrófilos de 1,0 para 2,0 ( $p=0,028$ , teste de Wilcoxon), pelo aumento da mediana do percentual de neutrófilos envolvidos na fagocitose de 1,0 para 1,75 ( $p=0,004$ , teste de Wilcoxon), pois não houve influência sobre a mediana do número de leveduras ingeridas/aderidas por neutrófilo ( 1,0 versus 1,33,  $p=0,934$ , teste de Wilcoxon) (**Figura 2**).

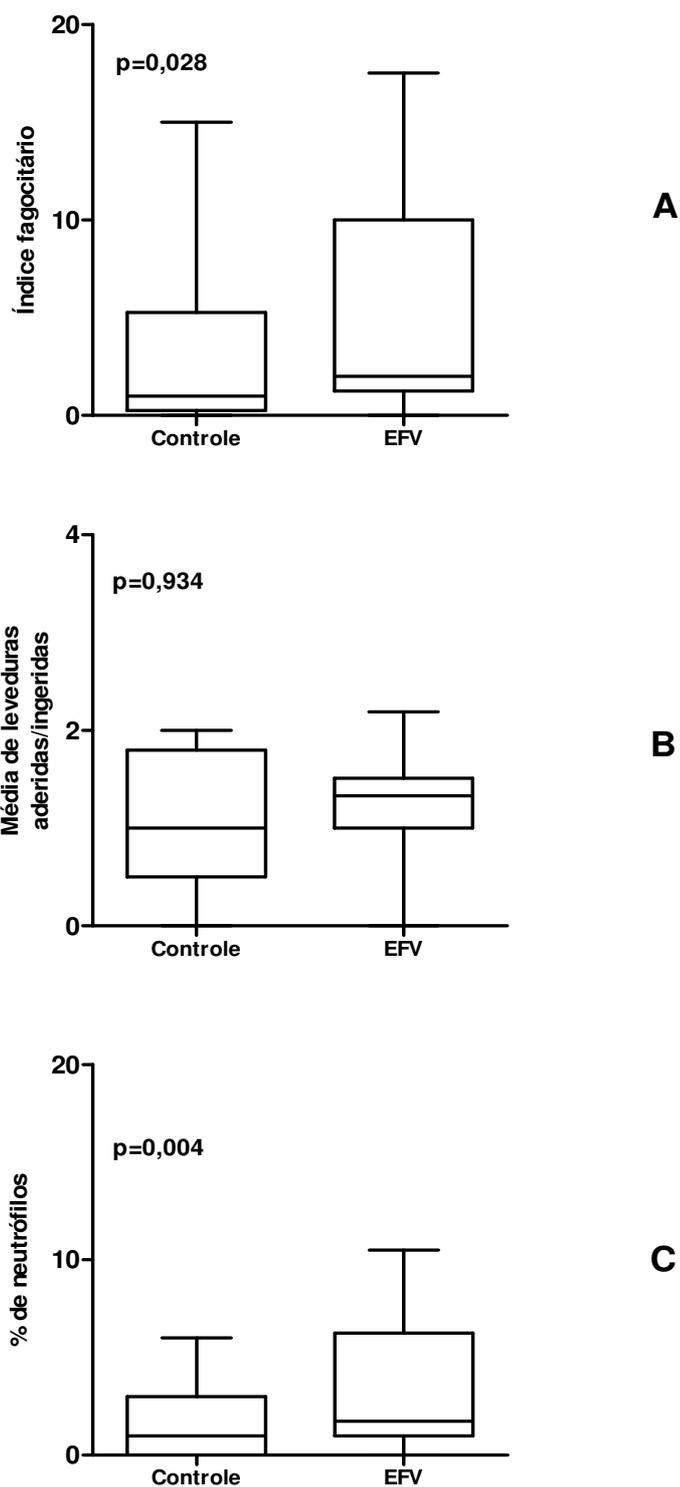


Figura 2. Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos com efavirenz por 30 minutos sobre a capacidade fagocitária, utilizando-se  $2,5 \times 10^5$  leveduras não sensibilizadas por escavação. A - Índice fagocitário; B - Média de leveduras ingeridas/aderidas por neutrófilo; C - Percentual de neutrófilos envolvidos na fagocitose. Em A: Aumento do índice fagocitário ( $p=0,028$ ). Em B: Não houve influência sobre as leveduras ingeridas/aderidas por neutrófilo ( $p=0,934$ ). Em C: Aumento do percentual de neutrófilos envolvidos na fagocitose ( $p=0,004$ ). Teste de Wilcoxon.

#### **4.1.2 - Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos de indivíduos normais com a associação lopinavir/ritonavir sobre a fagocitose por receptores para padrões moleculares de patógenos**

A exposição por 30 minutos ao lopinavir/ritonavir não alterou a capacidade fagocitária de neutrófilos mediada por receptores para padrões moleculares de patógenos. Com o aumento do tempo de exposição para 60 minutos, observou-se um decréscimo significativo da capacidade fagocitária, demonstrada pela redução da mediana do índice fagocitário (de 1,0 para 0,0,  $p=0,024$ , teste de Wilcoxon) ocasionada pela queda das medianas do número de leveduras aderidas/ingeridas por neutrófilo (de 1,0 para 0,0,  $p=0,090$ , teste de Wilcoxon) e do percentual de neutrófilos envolvidos na fagocitose (de 1,0 para 0,0,  $p=0,047$ , teste de Wilcoxon) (**Figura 3**).

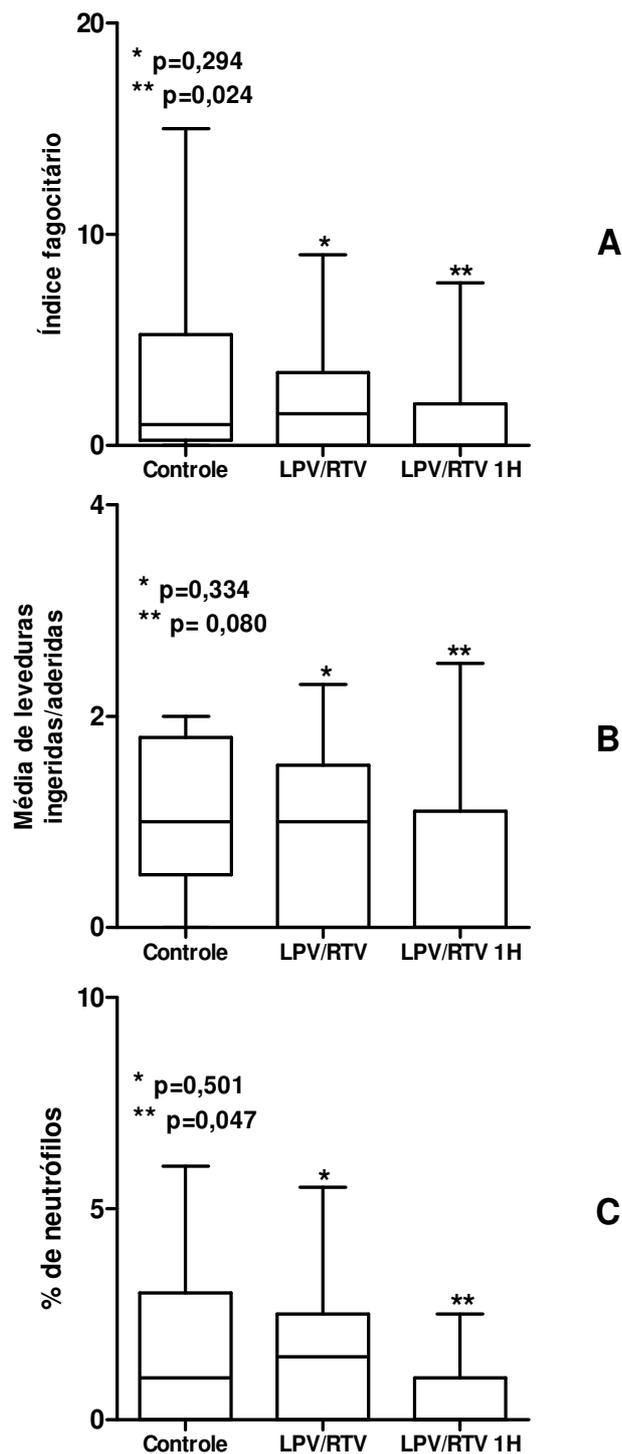


Figura 3. Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos com lopinavir/ritonavir por 30 (\*) e 60 (\*\*) minutos sobre a capacidade fagocitária, utilizando-se  $2,5 \times 10^5$  leveduras não sensibilizadas por escavação. A - Índice fagocitário; B - Média de leveduras ingeridas/aderidas por neutrófilo; C - Percentual de neutrófilos envolvidos na fagocitose. Em A\*:  $p=0,294$ . Em B\*:  $p=0,334$ . Em C\*:  $p=0,501$ . Em A\*\*: Diminuição do índice fagocitário ( $p=0,024$ ). Em B\*\*: Tendência à diminuição da média de leveduras ingeridas/aderidas por neutrófilo ( $p=0,080$ ). Em C\*\*: Diminuição do percentual de neutrófilos envolvidos na fagocitose ( $p=0,047$ ). Teste de Wilcoxon.

#### **4.1.3 - Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos de indivíduos normais com a associação zidovudina, lamivudina e lopinavir/ritonavir sobre a fagocitose pelos receptores para padrões moleculares de patógenos**

Após 30 minutos de incubação com a associação das drogas, não se observou alterações estatisticamente significativas na capacidade fagocitária dos neutrófilos. Porém, aos 60 minutos houve diminuição do índice fagocitário ( $p=0,008$ , teste de Wilcoxon), da média de leveduras ingeridas/aderidas por neutrófilo ( $p=0,032$ , teste de Wilcoxon) e do percentual de neutrófilos envolvidos na fagocitose ( $p=0,032$ , teste de Wilcoxon) (**Figura 4**).

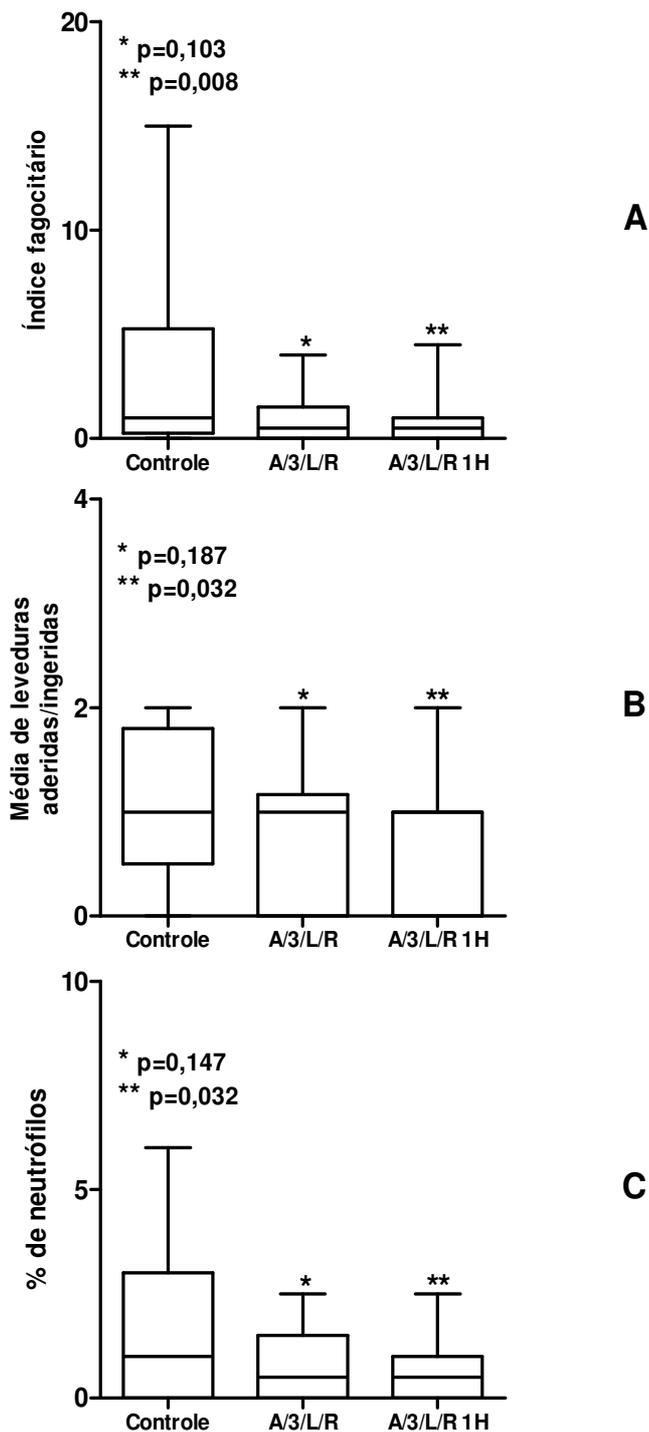


Figura 4. Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos com zidovudina, lamivudina e lopinavir/ritonavir por 30 (\*) e 60(\*\*) minutos sobre a capacidade fagocitária, utilizando-se  $2,5 \times 10^5$  leveduras não sensibilizadas por escavação. A - Índice fagocitário; B - Média de leveduras ingeridas/aderidas por neutrófilo; C - Percentual de neutrófilos envolvidos na fagocitose. Em A\*:  $p=0,103$ . Em B\*:  $p=0,187$ . Em C\*:  $p=0,147$ . Em A\*\*: Redução do índice fagocitário ( $p=0,008$ ). Em B\*\*: Redução da média de leveduras ingeridas/aderidas por neutrófilo ( $p=0,032$ ). Em C\*\*: Redução do percentual de neutrófilos envolvidos na fagocitose ( $p=0,032$ ). Teste de Wilcoxon.

#### **4.1.4 - Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos de indivíduos normais com zidovudina, lamivudina isoladamente e da associação zidovudina, lamivudina e efavirenz sobre a fagocitose pelos receptores para padrões moleculares de patógenos**

Não houve diferença estatística significativa na capacidade fagocitária de neutrófilos por meio dos receptores para padrões moleculares de patógenos após o tratamento *in vitro* com os antiretrovirais zidovudina (**Figura 5**) e lamivudina (**Figura 6**) isoladamente e com a associação zidovudina, lamivudina e efavirenz (**Figura 7**).

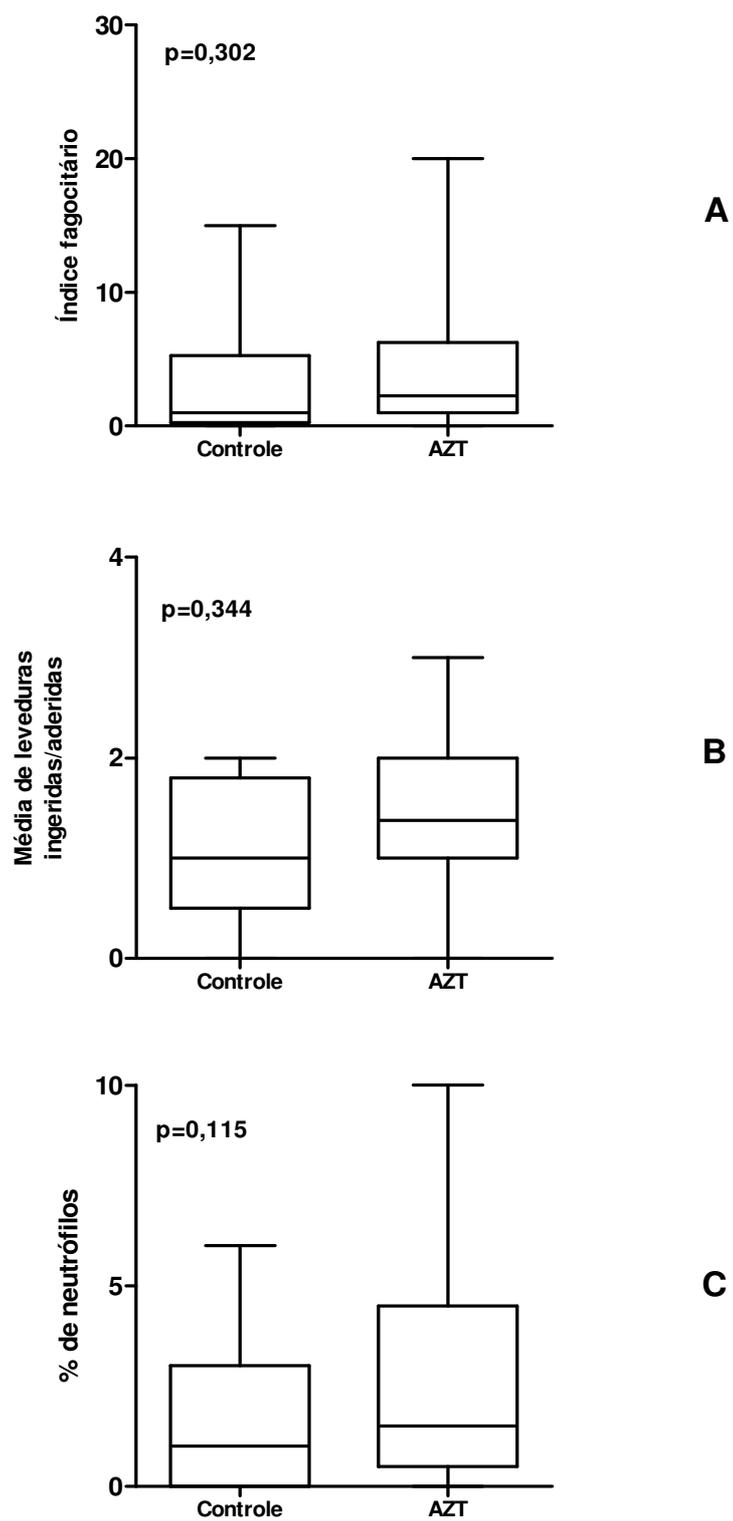


Figura 5: Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos com zidovudina por 30 minutos sobre a capacidade fagocitária, utilizando-se  $2,5 \times 10^5$  leveduras não sensibilizadas por escavação. A - Índice fagocitário; B - Média de leveduras ingeridas/aderidas por neutrófilo; C - Percentual de neutrófilos envolvidos na fagocitose; Em A:  $p=0,302$ . Em B:  $p=0,344$ . Em C:  $p=0,115$ . Teste de Wilcoxon.

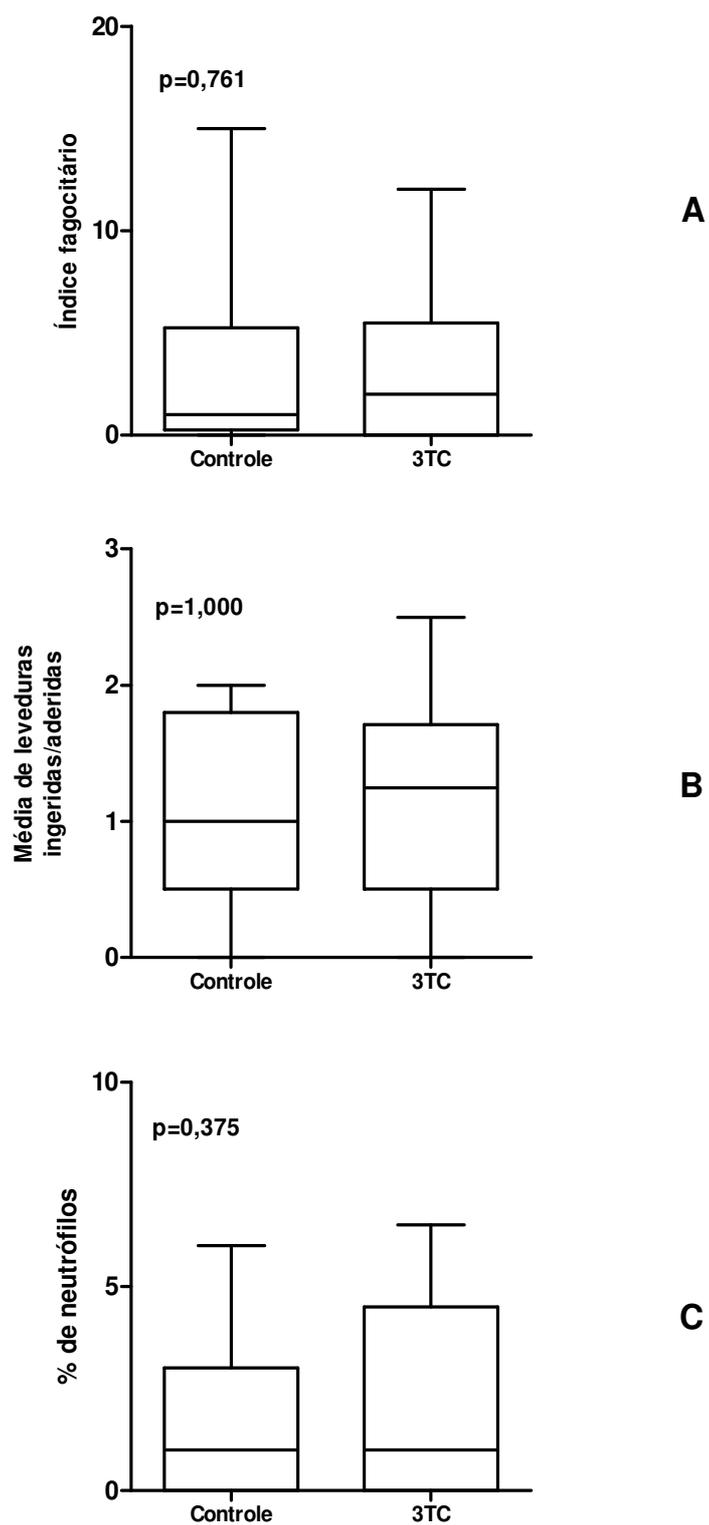


Figura 6. Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos com lamivudina por 30 minutos sobre a capacidade fagocitária, utilizando-se  $2,5 \times 10^5$  leveduras não sensibilizadas por escavação. A - Índice fagocitário; B - Média de leveduras ingeridas/aderidas por neutrófilo; C - Percentual de neutrófilos envolvidos na fagocitose. Em A:  $p=0,761$ . Em B:  $p=1,000$ . Em C:  $p=0,375$ . Teste de Wilcoxon.

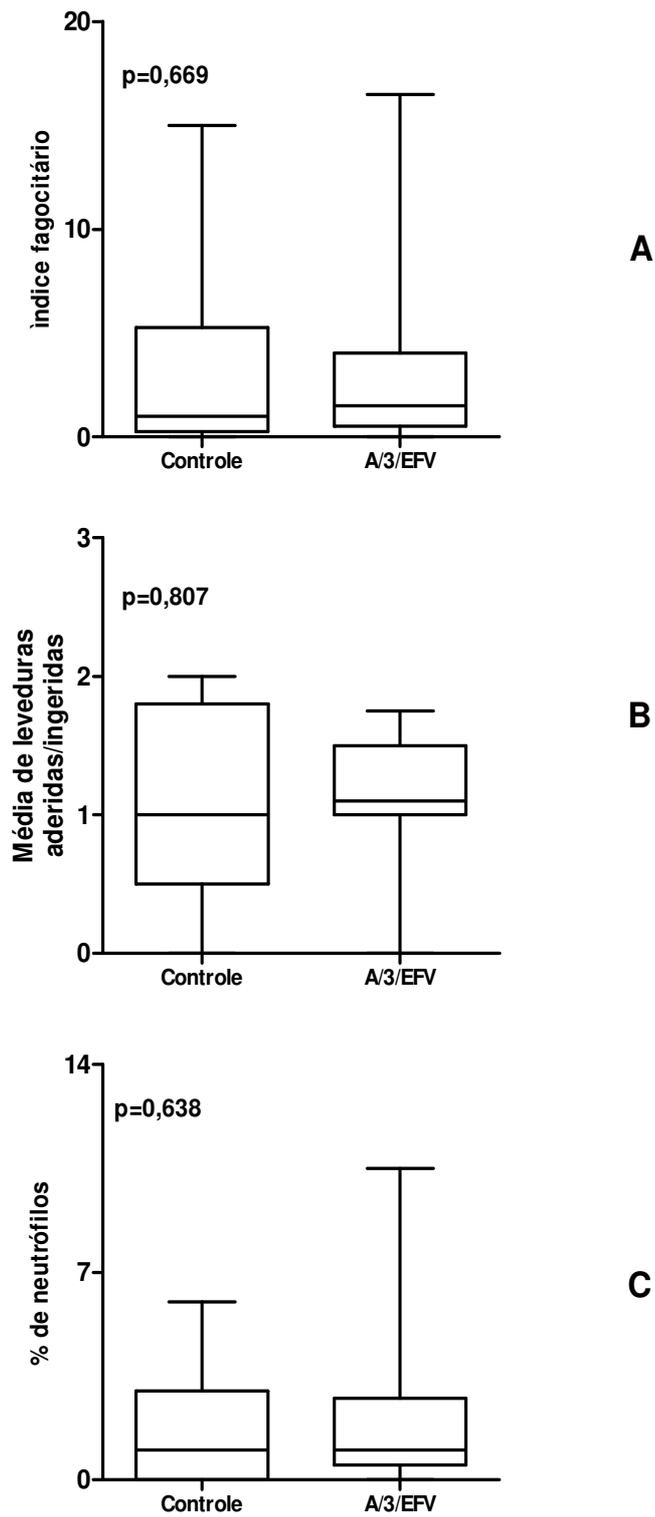
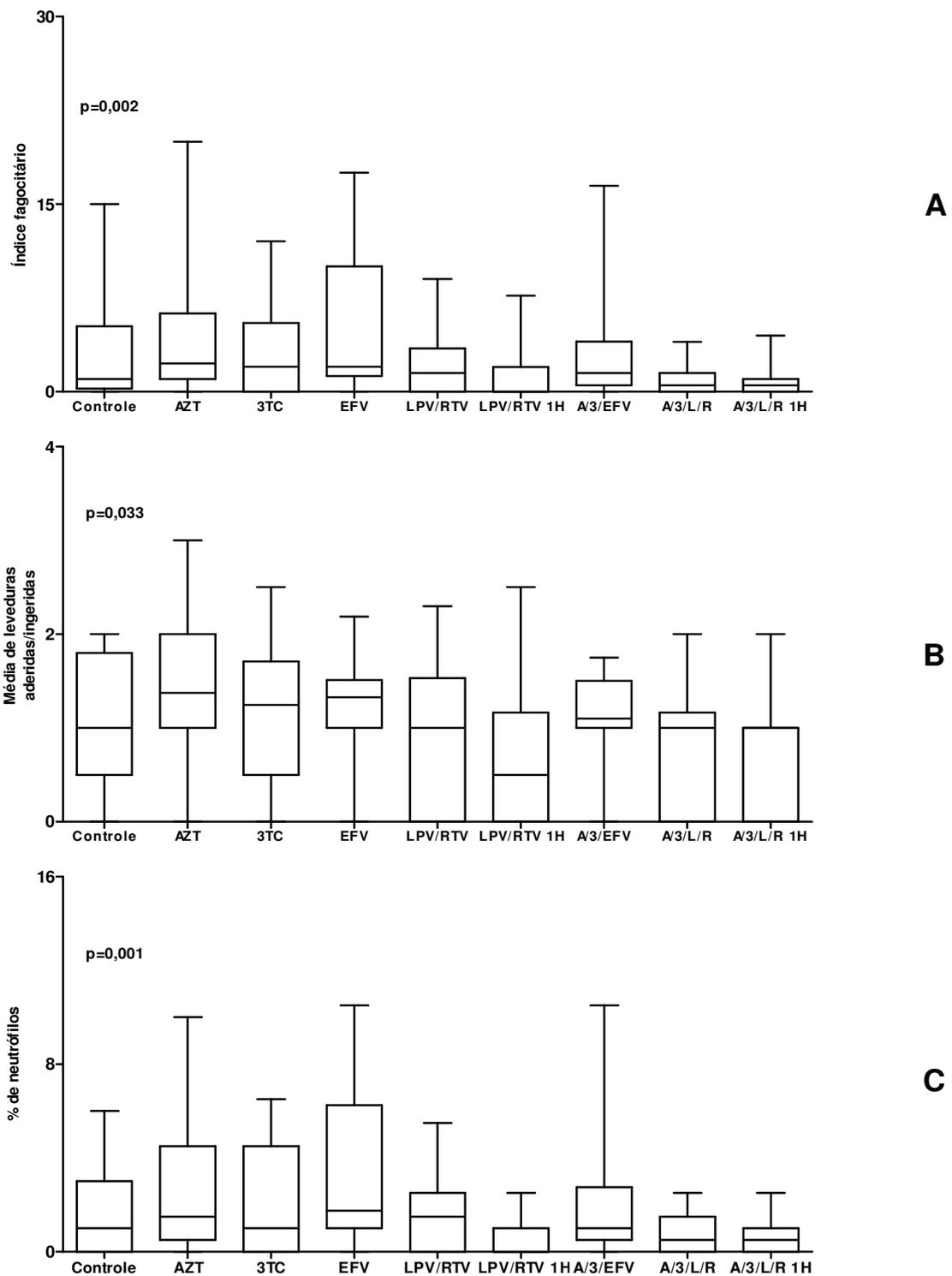


Figura 7. Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos com a associação zidovudina, lamivudina e efavirenz por 30 minutos sobre a capacidade fagocitária, utilizando-se  $2,5 \times 10^5$  leveduras não sensibilizadas por escavação. A - Índice fagocitário; B - Média de leveduras ingeridas/aderidas por neutrófilo; C - Percentual de neutrófilos envolvidos na fagocitose. Em A: p=0,669. Em B: p=0,807. Em C: p=0,638. Teste de Wilcoxon.

#### 4.1.5 - Análise comparativa da influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos de indivíduos normais com zidovudina, lamivudina, efavirenz e lopinavir/ritonavir isolados ou associados sobre a fagocitose mediada por receptores para padrões moleculares de patógenos

Na avaliação comparativa da influência das diferentes drogas sobre os fagócitos, observou-se diferença significativa das medianas do índice fagocitário ( $p=0,002$ , Kruskal-Wallis), da média de leveduras fagocitadas por neutrófilo ( $p=0,033$ , Kruskal-Wallis) e do percentual de neutrófilos envolvidos na fagocitose ( $p=0,001$ , Kruskal-Wallis) entre os grupos estudados (**Figura 8**). Demonstrou-se que o grupo tratado com efavirenz apresentou a mediana do índice fagocitário superior ao exposto à associação zidovudina, lamivudina e lopinavir/ritonavir por 60 minutos ( $p<0,05$ , teste de Dunn). Verificou-se também que a mediana do percentual de neutrófilos envolvidos na fagocitose foi maior no grupo tratado com efavirenz do que com lopinavir/ritonavir por 60 minutos ( $p<0,05$ , teste de Dunn) e zidovudina lamivudina e lopinavir/ritonavir por 30 minutos ( $p<0,05$ , teste de Dunn) (**Figura 8**).



**Figura 8.** Comparação do índice fagocitário, média de leveduras ingeridas/aderidas por neutrófilo e percentual de neutrófilos envolvidos na fagocitose de leveduras não sensibilizadas entre os grupos estudados e seus respectivos controles. Em A, B e C houve diferença estatística entre os índices fagocitários ( $p=0,002$ ), médias de leveduras ingeridas/aderidas por neutrófilo ( $p=0,033$ ) e percentual de neutrófilos envolvidos na fagocitose ( $p=0,001$ ). Kruskal-Wallis. IF do EFV > A3/L/R 1H e percentual de neutrófilos do EFV > LPV/RTV 1H e > A3/L/R 1H ( $p<0,05$ , teste de Dunn).

#### **4.1.6 - Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos de indivíduos normais com efavirenz sobre a fagocitose pelos receptores para opsoninas**

Embora o efavirenz não tenha alterado a capacidade fagocitária de neutrófilos mediada por opsoninas, verificou-se que esta droga induziu um maior envolvimento dos neutrófilos na fagocitose ( $p=0,020$ , teste t pareado) **(Figura 9)**.

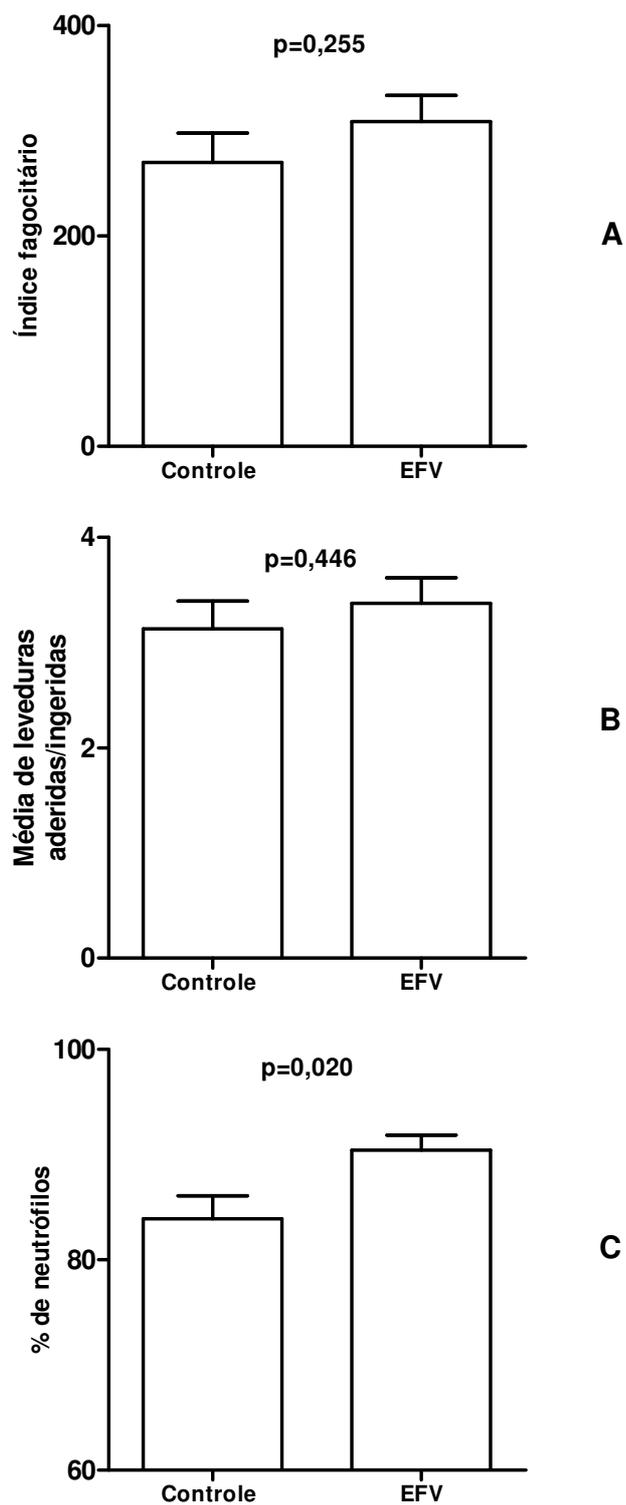


Figura 9. Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos com efavirenz por 30 minutos sobre a capacidade fagocitária, utilizando-se  $2,5 \times 10^5$  leveduras sensibilizadas por escavação. A - Índice fagocitário; B - Média de leveduras ingeridas/aderidas por neutrófilo; C - Percentual de neutrófilos envolvidos na fagocitose. Em A:  $p=0,255$ . Em B:  $p=0,446$ . Em C:  $p=0,020$ . Teste t pareado.

#### **4.1.7 - Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos de indivíduos normais com zidovudina, lamivudina, efavirenz, lopinavir/ritonavir isoladamente e das associações zidovudina, lamivudina com efavirenz ou lopinavir/ritonavir sobre a fagocitose pelos receptores para opsoninas**

A exposição dos neutrófilos aos medicamentos zidovudina (**Figura 10**), lamivudina (**Figura 11**), lopinavir/ritonavir (**Figura 12**) ou as associações zidovudina, lamivudina, efavirenz (**Figura 13**) e zidovudina, lamivudina, lopinavir/ritonavir (**Figura 14**) não alterou a capacidade fagocitária mediada por receptores para opsoninas. Observou-se apenas uma tendência ao aumento da mediana do percentual de neutrófilos envolvidos na fagocitose quando estas células foram incubadas por 30 minutos com lopinavir/ritonavir ( $p=0,071$ , teste de Wilcoxon).

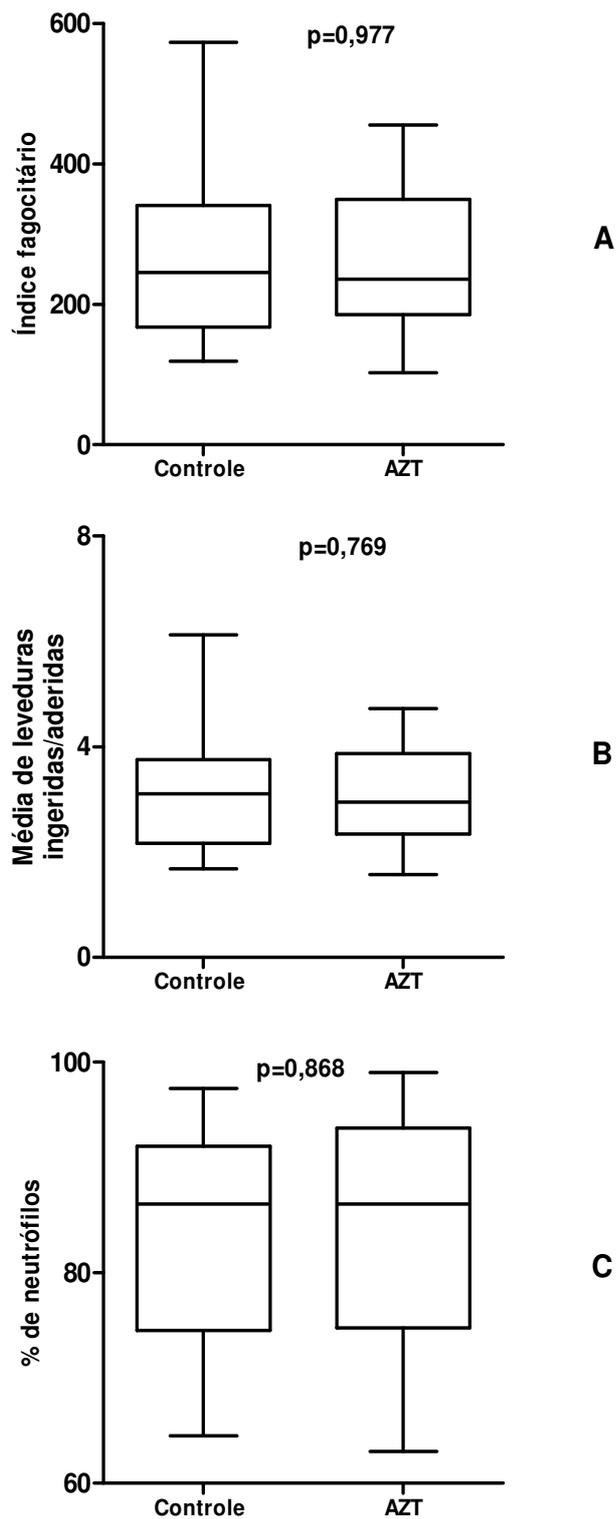


Figura 10. Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos com zidovudina por 30 minutos sobre a capacidade fagocitária, utilizando-se  $2,5 \times 10^5$  leveduras sensibilizadas por escavação. A - Índice fagocitário; B - Média de leveduras ingeridas/aderidas por neutrófilo; C - Percentual de neutrófilos envolvidos na fagocitose. Em A:  $p=0,977$ , teste de Wilcoxon. Em B:  $p=0,769$ , teste t pareado. Em C:  $p=0,868$ , teste t pareado.

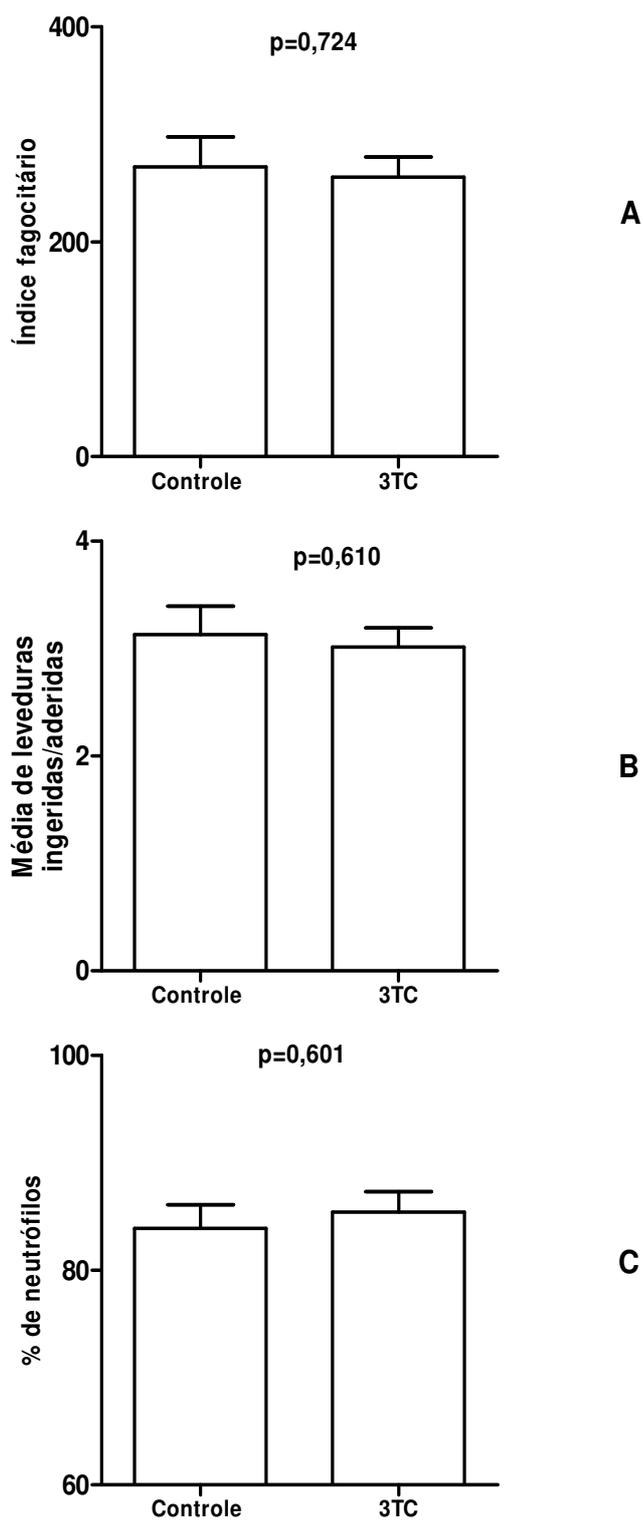


Figura 11. Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos com lamivudina por 30 minutos sobre a capacidade fagocitária, utilizando-se  $2,5 \times 10^5$  leveduras sensibilizadas por escavação. A - Índice fagocitário; B - Média de leveduras ingeridas/aderidas por neutrófilo; C - Percentual de neutrófilos envolvidos na fagocitose. Em A:  $p=0,724$ . Em B:  $p=0,610$ . Em C:  $p=0,601$ . Teste t pareado.

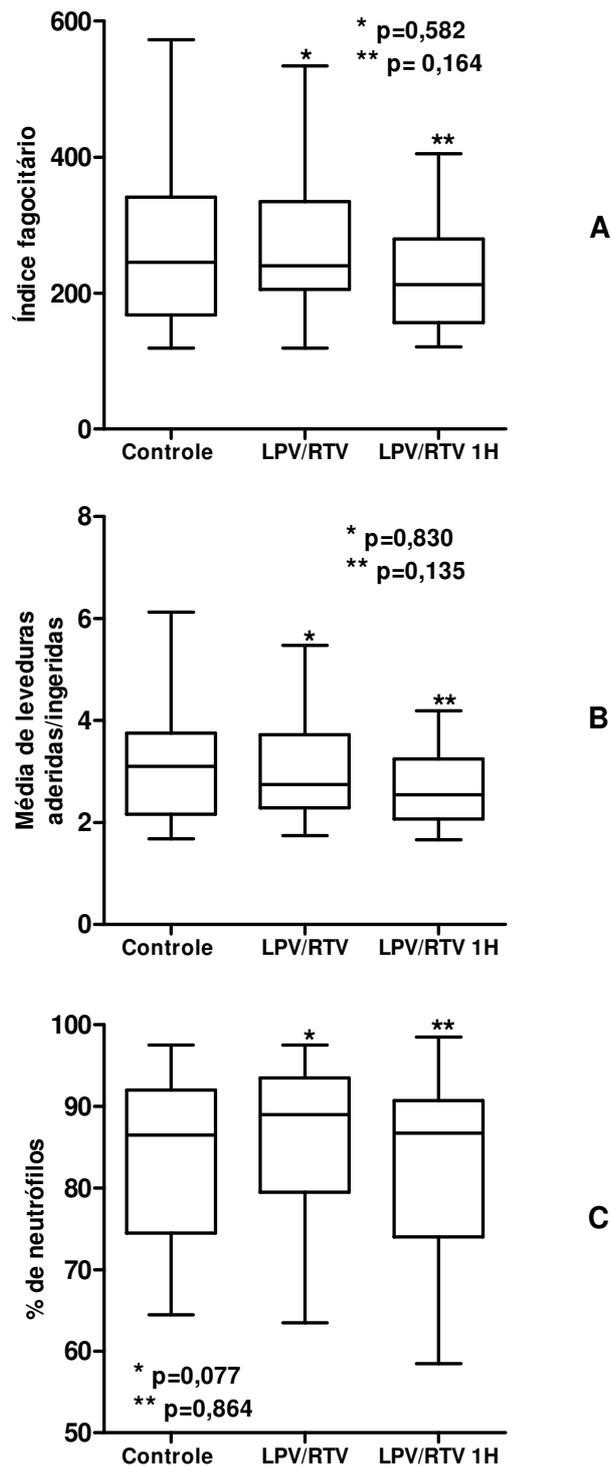


Figura 12. Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos com lopinavir/ritonavir por 30 (\*) e 60 (\*\*) minutos sobre a capacidade fagocitária, utilizando-se  $2,5 \times 10^5$  leveduras sensibilizadas por escavação. A - Índice fagocitário; B - Média de leveduras ingeridas/aderidas por neutrófilo; C - Percentual de neutrófilos envolvidos na fagocitose. Em A\*:  $p=0,582$ . Em B\*:  $p=0,830$ . Em C\*:  $p=0,077$ . Teste de Wilcoxon. Em A\*\*:  $p=0,164$ . Em B\*\*:  $p=0,135$ . Em C\*\*:  $p=0,864$ . Teste t pareado.

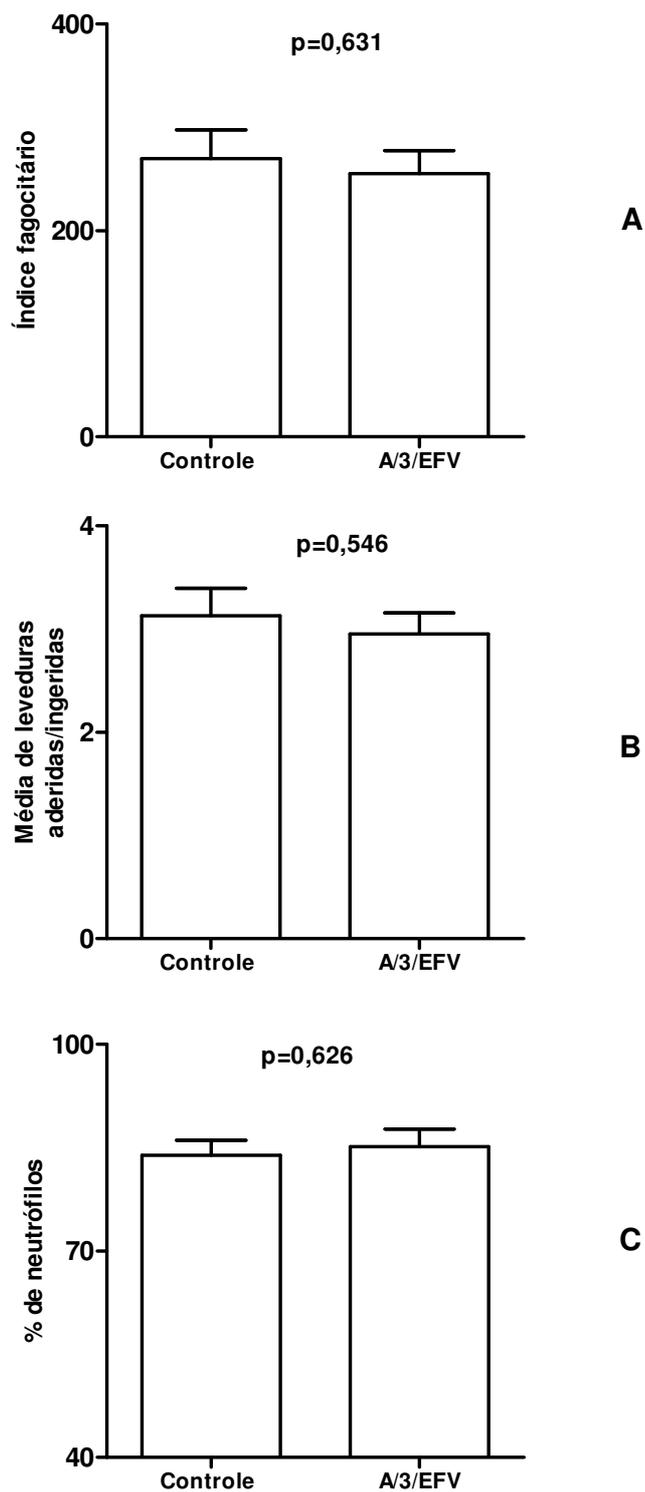


Figura 13. Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos com zidovudina, lamivudina e efavirenz por 30 minutos sobre a capacidade fagocitária, utilizando-se  $2,5 \times 10^5$  leveduras sensibilizadas por escavação. A - Índice fagocitário; B - Média de leveduras ingeridas/aderidas por neutrófilo; C - Percentual de neutrófilos envolvidos na fagocitose. Em A:  $p=0,631$ . Em B:  $p=0,546$ . Em C:  $p=0,626$ . Teste t pareado.

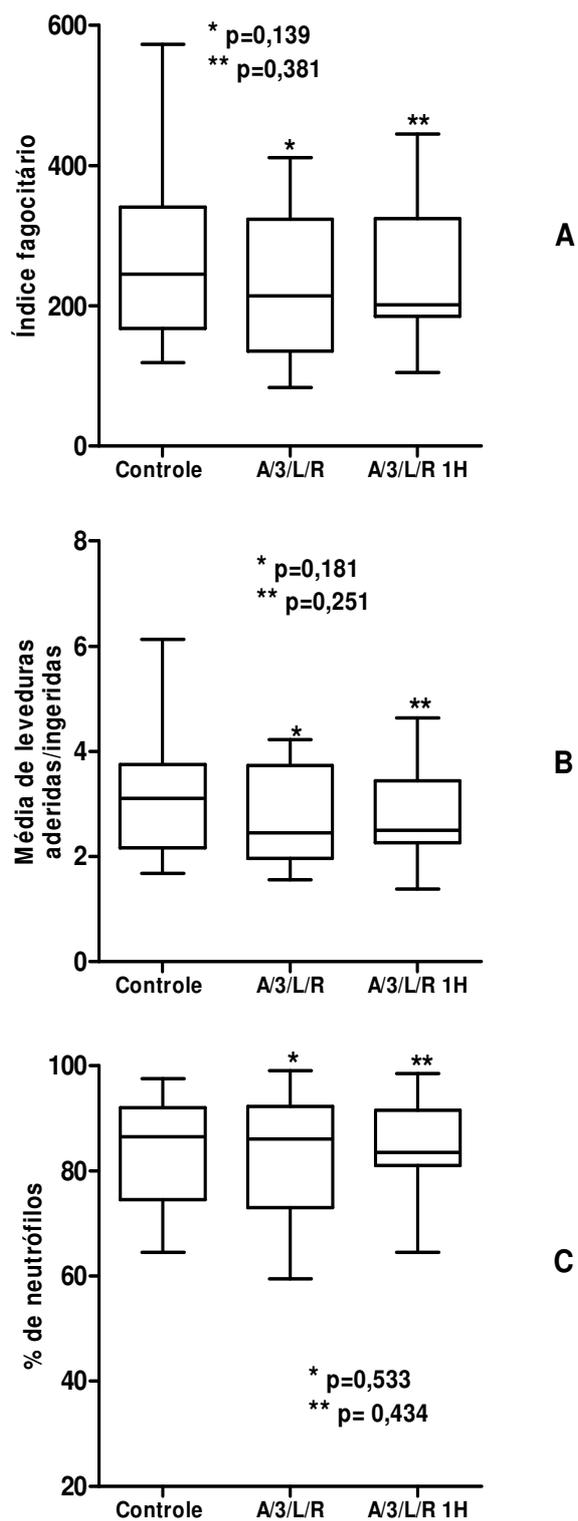
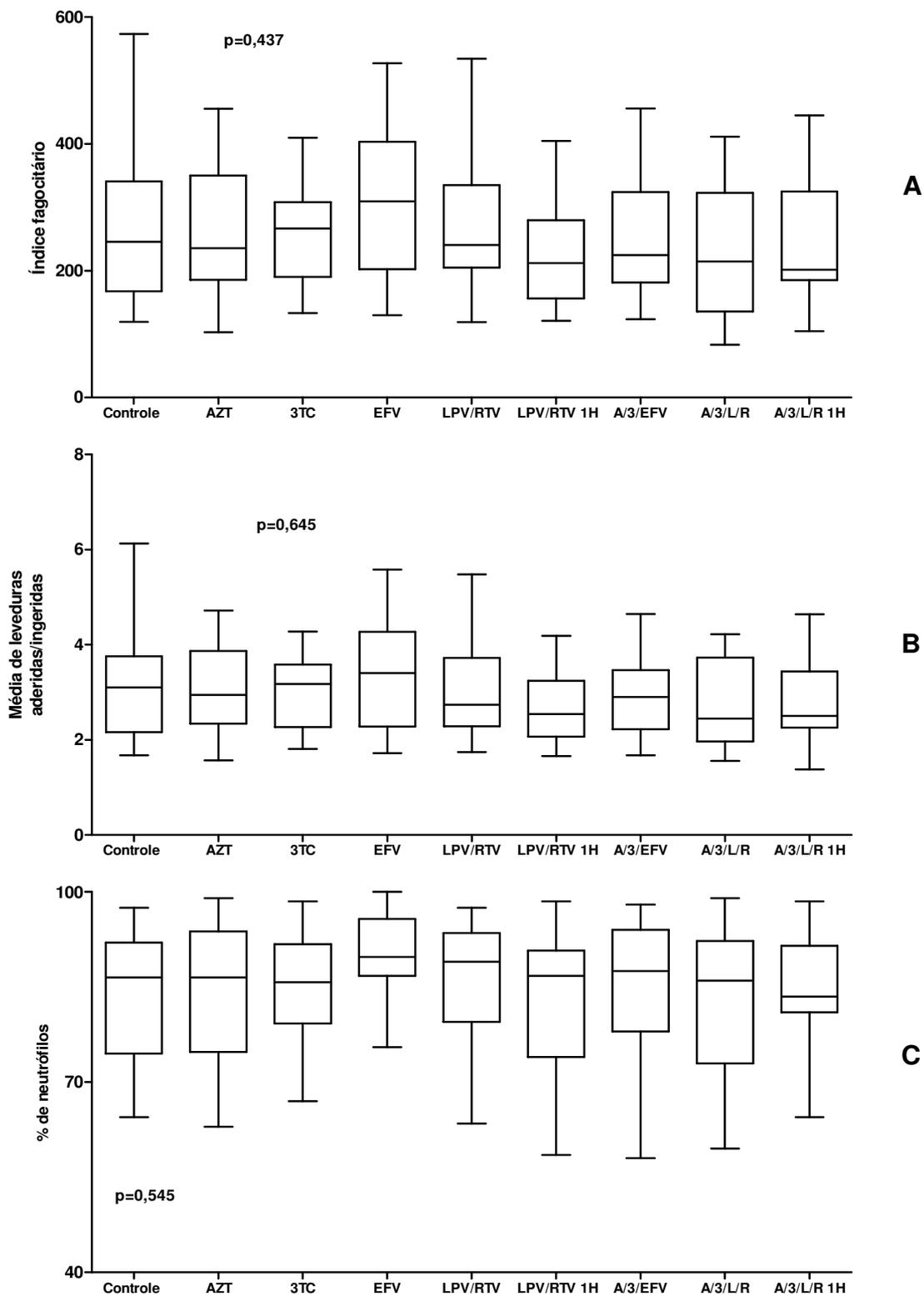


Figura 14. Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos com zidovudina, lamivudina e lopinavir/ritonavir por 30(\*) e 60(\*\*) minutos sobre a capacidade fagocitária, utilizando-se  $2,5 \times 10^5$  leveduras sensibilizadas por escavação. A - Índice fagocitário; B - Média de leveduras ingeridas/aderidas por neutrófilo; C - Percentual de neutrófilos envolvidos na fagocitose. Em A\*:  $p=0,139$ . Em B\*:  $p=0,181$ . Em C\*:  $p=0,533$ . Teste t pareado. Em A\*\*:  $p=0,381$ , teste de Wilcoxon. Em B\*\*:  $p=0,251$ , teste t pareado. Em C\*\*:  $p=0,434$ , teste t pareado.

#### **4.1.8 - Análise comparativa da influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos de indivíduos normais com zidovudina, lamivudina, efavirenz e lopinavir/ritonavir isolados ou associados sobre a fagocitose mediada por opsoninas**

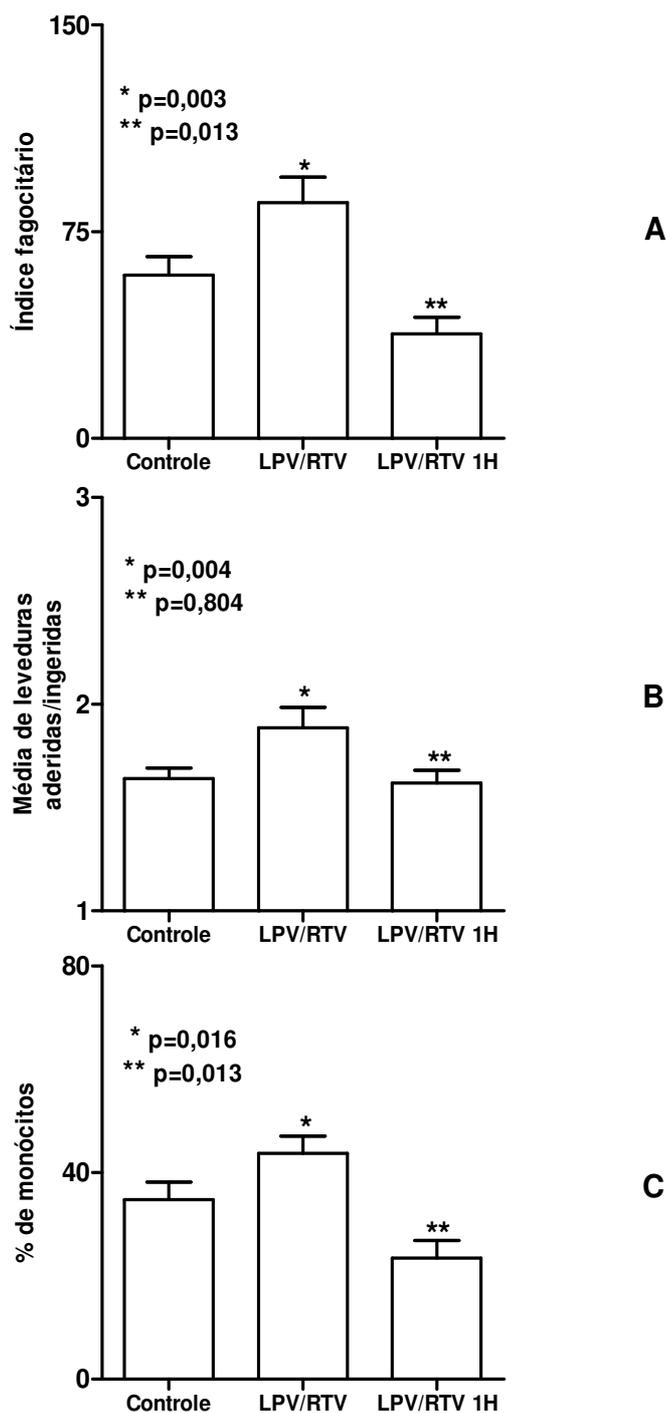
Não houve diferença estatisticamente significativa entre as medianas do índice fagocitário ( $p=0,437$ , Kruskal-Wallis), da média de leveduras fagocitadas por neutrófilo ( $p=0,645$ , Kruskal-Wallis) e do percentual de neutrófilos envolvidos na fagocitose ( $p=0,545$ , Kruskal-Wallis) entre os grupos estudados e seus respectivos controles quando a fagocitose foi efetuada por meio dos receptores para opsoninas (**Figura 15**).



**Figura 15.** Comparação do índice fagocitário, média de leveduras ingeridas/aderidas por neutrófilo e percentual de neutrófilos envolvidos na fagocitose de leveduras sensibilizadas entre os grupos estudados. Em A, B e C não houve diferença estatística entre os índices fagocitários ( $p=0,437$ ), médias de leveduras fagocitadas por neutrófilo ( $p=0,645$ ) e percentual de neutrófilos envolvidos na fagocitose ( $p=0,545$ ). Kruskal-Wallis.

#### **4.1.9 - Influência do tratamento *in vitro* de monócitos de indivíduos normais com lopinavir/ritonavir sobre a fagocitose pelos receptores para padrões moleculares de patógenos**

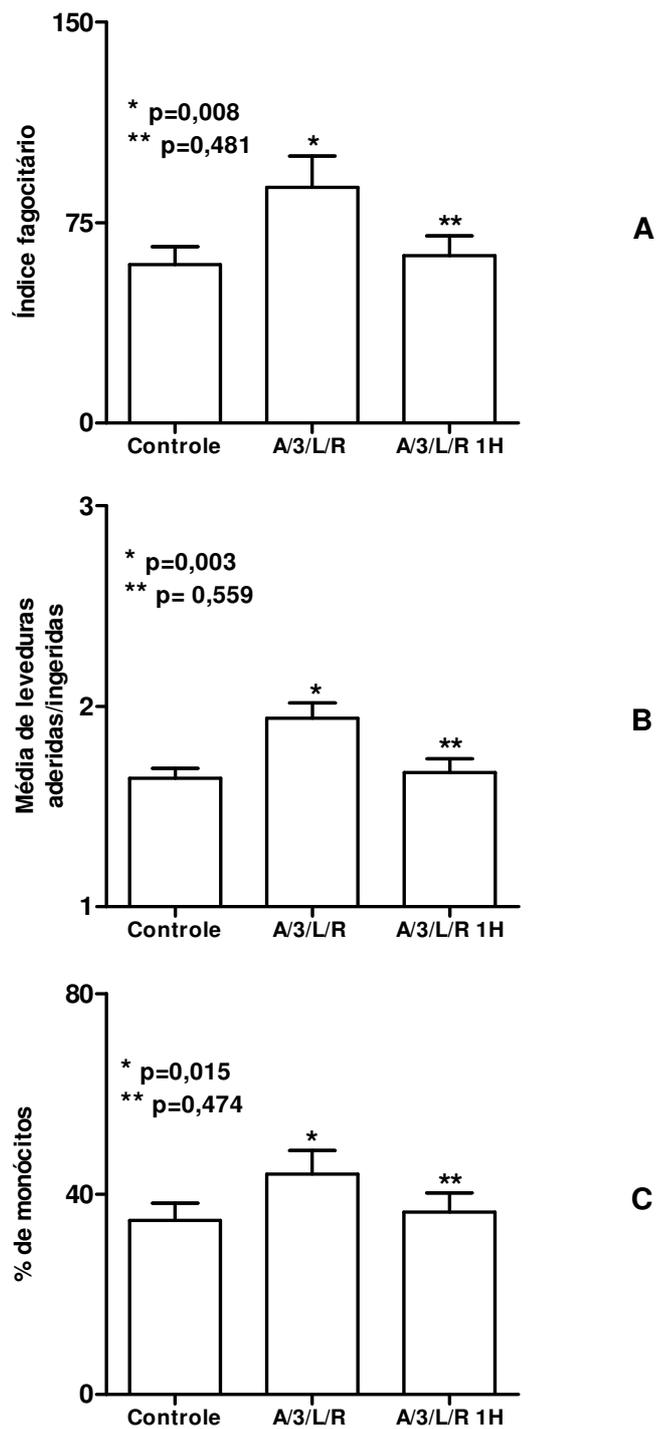
Quando monócitos foram expostos ao lopinavir/ritonavir durante 30 minutos observaram-se elevações significativas da média  $\pm$  DP do percentual de monócitos envolvidos na fagocitose de  $34,8 \pm 14,7\%$  para  $43,7 \pm 14,9\%$  ( $p=0,016$ , teste t pareado) e da média  $\pm$  DP do número de leveduras ingeridas/aderidas por monócito de  $1,6 \pm 0,2$  para  $1,8 \pm 0,4$  ( $p=0,004$ , teste t pareado). O aumento desses dois parâmetros determinou aumento da média  $\pm$  DP do índice fagocitário de  $59,3 \pm 29,4$  para  $85,6 \pm 41,8$  ( $p=0,003$ , teste t pareado). Observou-se que a exposição mais prolongada (60 minutos) teve o efeito oposto, promovendo um decréscimo da média  $\pm$  DP do índice fagocitário de  $59,3 \pm 29,4$  para  $37,9 \pm 25,3$  ( $p= 0,013$ , teste t pareado) em virtude da redução da média  $\pm$  DP do percentual de monócitos envolvidos na fagocitose de  $34,8 \pm 14,7\%$  para  $23,5 \pm 13,9$  ( $p=0,016$ , teste t pareado), já que não houve alteração da média  $\pm$  DP do número de leveduras aderidas/ingeridas por monócito (**Figura 16**).



**Figura 16:** Influência do tratamento *in vitro* de monócitos com lopinavir/ritonavir por 30(\*) e 60(\*\*) minutos sobre a capacidade fagocitária, utilizando-se  $2,5 \times 10^5$  leveduras não sensibilizadas por escavação. A - Índice fagocitário; B - Média de leveduras ingeridas/aderidas por monócito; C - Percentual de monócitos envolvidos na fagocitose. Em A\*: Aumento do índice fagocitário ( $p=0,003$ ). Em B\*: Aumento da média de leveduras ingeridas/aderidas por monócito ( $p=0,004$ ). Em C\*: Aumento do percentual de monócitos envolvidos na fagocitose ( $p=0,016$ ). Teste t pareado. Em A\*\*: Redução do índice fagocitário ( $p=0,013$ ). Em B\*\*:  $p=0,804$ . Em C\*\*: Redução do percentual de monócitos envolvidos na fagocitose ( $p=0,013$ ). Teste t pareado.

#### **4.1.10 - Influência do tratamento *in vitro* de monócitos de indivíduos normais com a associação zidovudina, lamivudina e lopinavir/ritonavir sobre a fagocitose pelos receptores para padrões moleculares de patógenos**

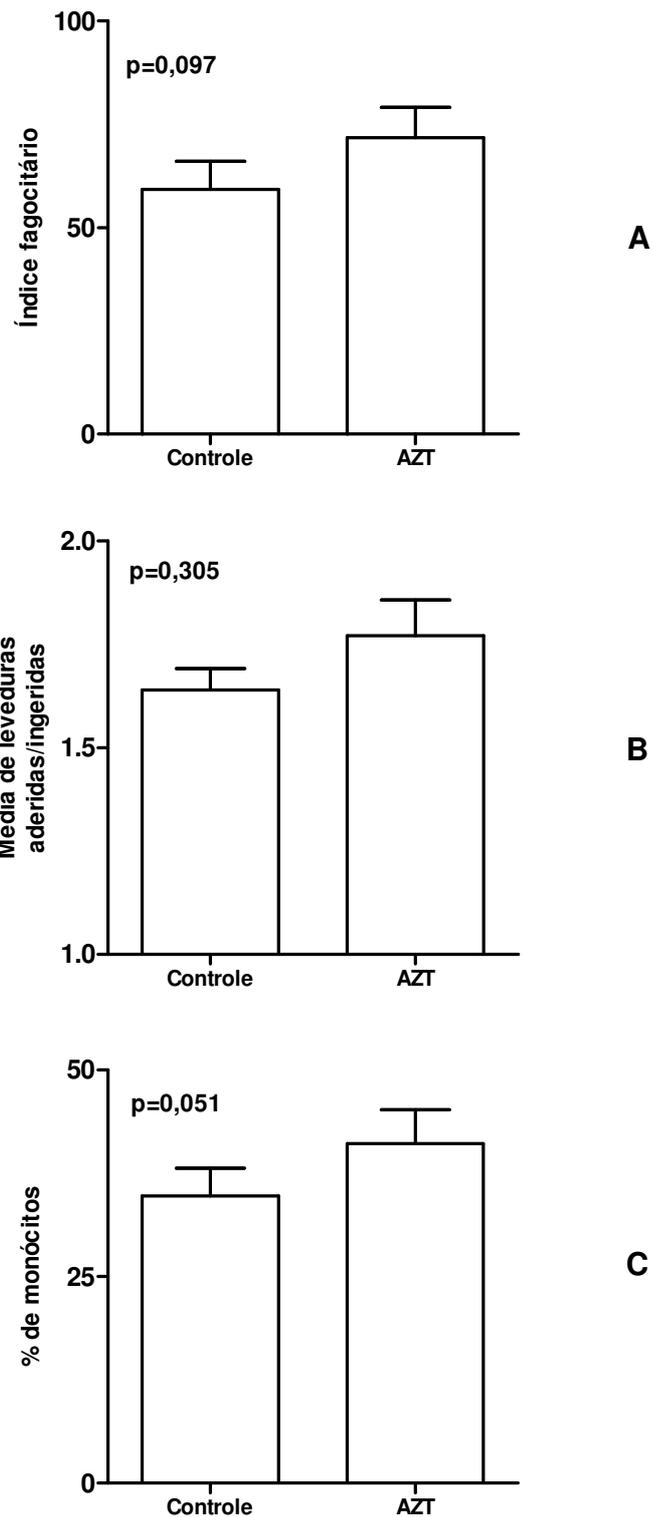
Em monócitos expostos por 30 minutos aos análogos de nucleosídeos zidovudina e lamivudina associados aos inibidores de protease lopinavir/ritonavir, observou-se um aumento da média  $\pm$  DP do índice fagocitário ( $p=0,008$ , teste t pareado) que se deveu a um incremento de 26,5% no percentual de monócitos envolvidos na fagocitose ( $p=0,003$ , teste t pareado) e de 18,4% na média de leveduras ingeridas/aderidas por monócito. Entretanto, o mesmo não foi observado quando as células foram tratadas por 60 minutos (**Figura 17**).



**Figura 17:** Influência do tratamento *in vitro* de monócitos com a associação zidovudina, lamivudina e lopinavir/ritonavir por 30 (\*) e 60 (\*\*) minutos sobre a capacidade fagocitária, utilizando-se  $2,5 \times 10^5$  leveduras não sensibilizadas por escavação. A - Índice fagocitário; B - Média de leveduras ingeridas/aderidas por monócito; C - Percentual de monócitos envolvidos na fagocitose. Em A\*: Aumento do índice fagocitário ( $p=0,008$ ). Em B\*: Aumento da média de leveduras ingeridas/aderidas por monócito ( $p=0,003$ ). Em C\*: Aumento do percentual de monócitos envolvidos na fagocitose ( $p=0,015$ ). Teste t pareado. Em A\*\*:  $p=0,481$ , teste de Wilcoxon. Em B\*\*:  $p=0,559$ , teste t pareado. Em C\*\*: $0,474$ , teste t pareado.

#### **4.1.11 - Influência do tratamento *in vitro* de monócitos de indivíduos normais com zidovudina sobre a fagocitose pelos receptores para padrões moleculares de patógenos**

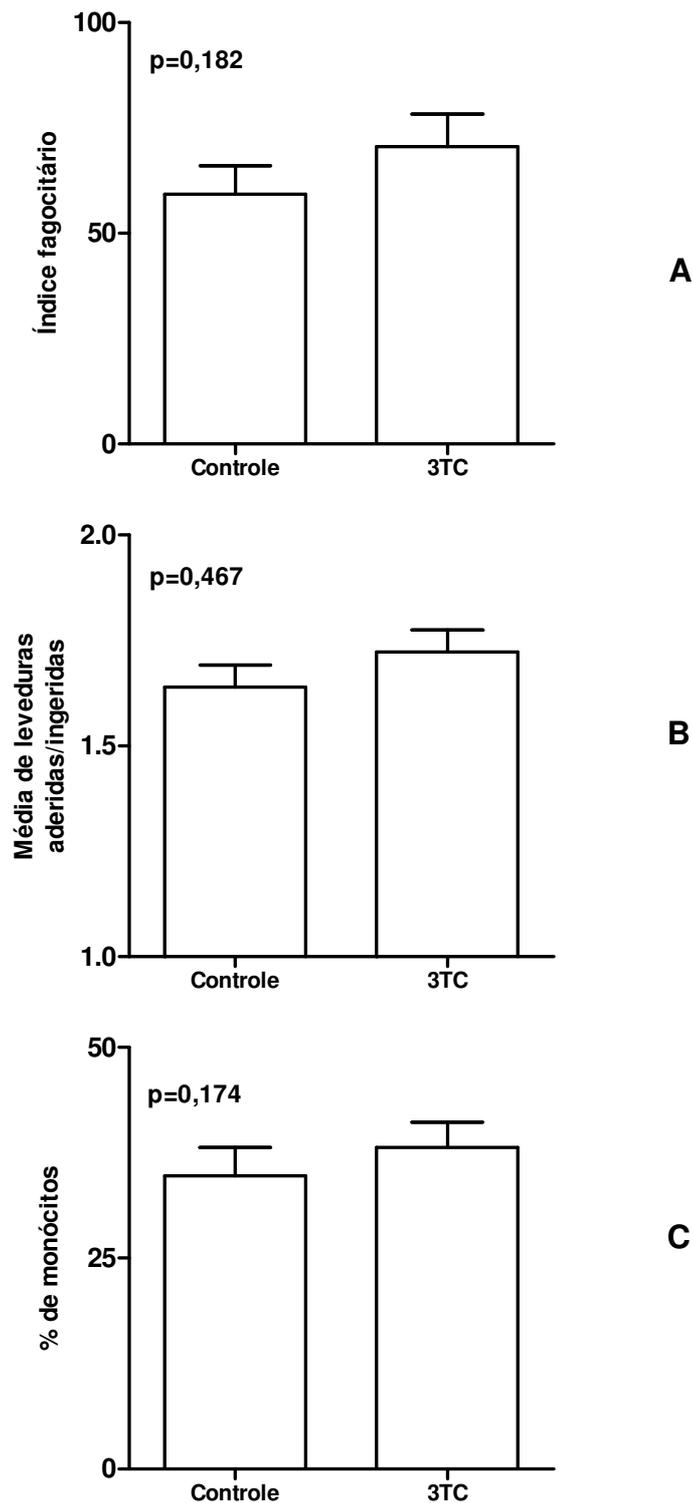
Os monócitos tratados com zidovudina tenderam a apresentar um aumento da capacidade fagocitária mediada pelos receptores para padrões moleculares de patógenos. Esta tendência deveu-se a elevação da média  $\pm$  DP do índice fagocitário de  $59,3 \pm 29,4$  para  $71,2 \pm 32,4$  ( $p=0,097$ , teste t pareado) em função do aumento da média  $\pm$  DP do percentual de monócitos envolvidos na fagocitose de  $34,7 \pm 14,7\%$  para  $41,1 \pm 17,8\%$  ( $p=0,051$ , teste t pareado), pois não houve alteração da média  $\pm$  DP do número de leveduras ingeridas/aderidas por monócito (**Figura 18**).



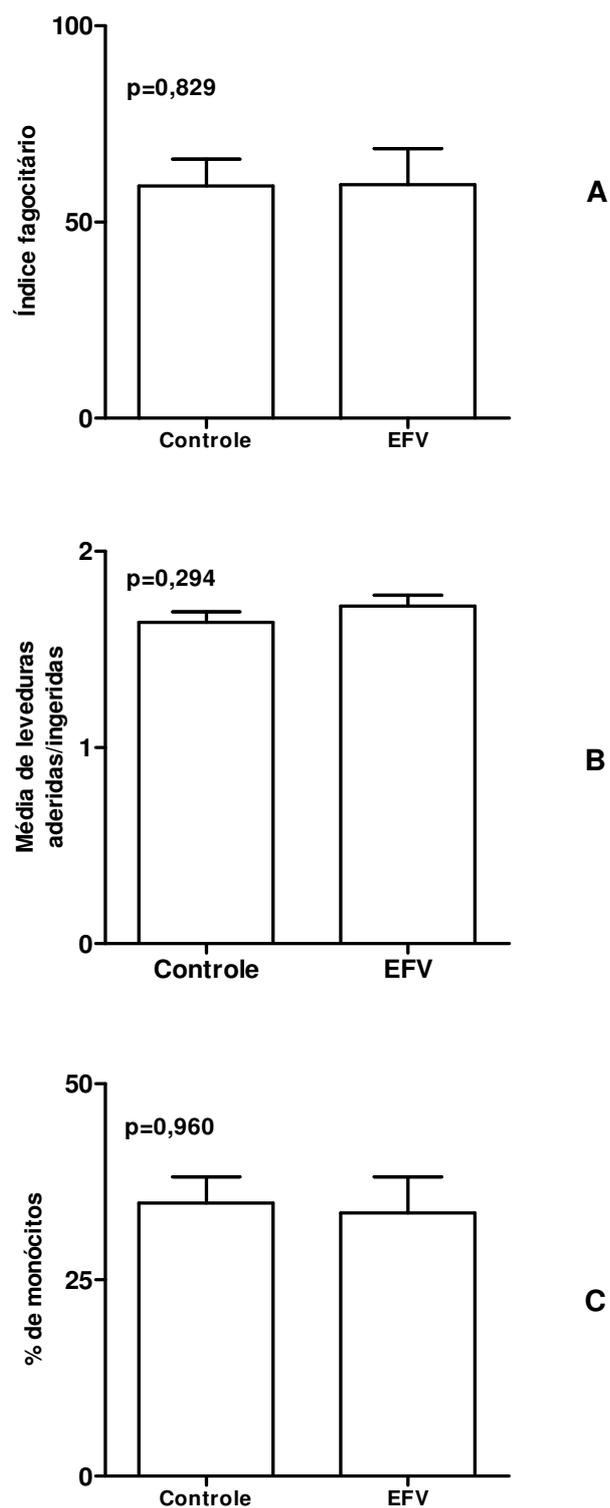
**Figura 18:** Influência do tratamento *in vitro* de monócitos com zidovudina por 30 minutos sobre a capacidade fagocitária, utilizando-se  $2,5 \times 10^5$  leveduras não sensibilizadas por escavação. A - Índice fagocitário; B - Média de leveduras ingeridas/aderidas por monócito; C - Percentual de monócitos envolvidos na fagocitose. Em A: Tendência ao aumento do índice fagocitário,  $p=0,097$ , teste t pareado. Em B:  $p=0,305$ , teste t pareado. Em C: Tendência ao aumento do percentual de monócitos envolvidos na fagocitose,  $p=0,051$ , teste t pareado.

#### **4.1.12 - Influência do tratamento *in vitro* de monócitos de indivíduos normais com lamivudina, efavirenz e da associação composta por zidovudina, lamivudina e efavirenz sobre a fagocitose pelos receptores para padrões moleculares de patógenos**

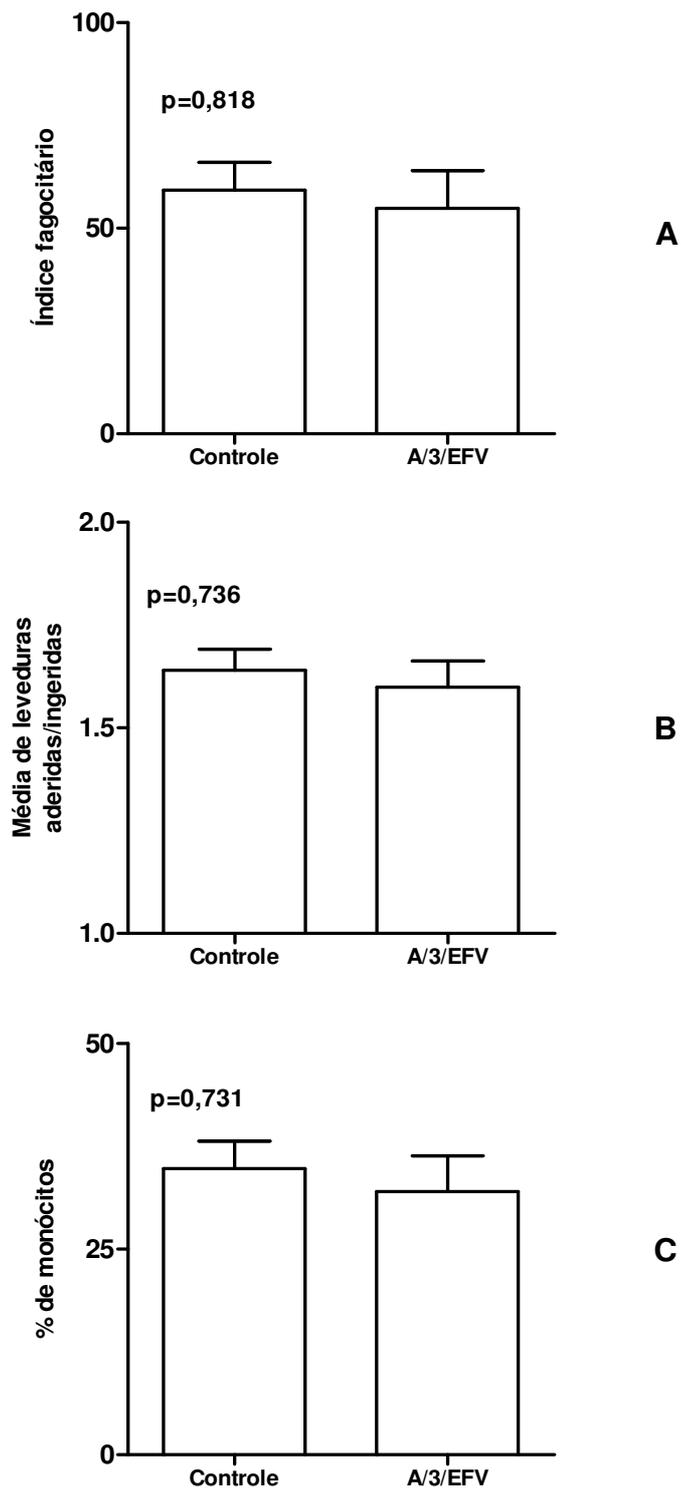
A lamivudina (**Figura 19**), o efavirenz (**Figura 20**) e a associação zidovudina, lamivudina e efavirenz (**Figura 21**) não influenciaram a capacidade fagocitária de monócitos mediada por receptores para padrões moleculares de patógenos.



**Figura 19:** Influência do tratamento *in vitro* de monócitos com lamivudina por 30 minutos sobre a capacidade fagocitária, utilizando-se  $2,5 \times 10^5$  leveduras não sensibilizadas por escavação. A - Índice fagocitário; B - Média de leveduras ingeridas/aderidas por monócito; C - Percentual de monócitos envolvidos na fagocitose. Em A:  $p=0,182$ . Em B:  $p=0,467$ . Em C:  $p=0,174$ . Teste t pareado.



**Figura 20:** Influência do tratamento *in vitro* de monócitos com efavirenz por 30 minutos sobre a capacidade fagocitária, utilizando-se  $2,5 \times 10^5$  leveduras não sensibilizadas por escavação. A - Índice fagocitário; B - Média de leveduras ingeridas/aderidas por monócito; C - Percentual de monócitos envolvidos na fagocitose. Em A:  $p=0,829$ . Em B:  $p=0,294$ . Em C:  $p=0,960$ . Teste t pareado.



**Figura 21:** Influência do tratamento *in vitro* de monócitos com zidovudina, lamivudina e efavirenz por 30 minutos sobre a capacidade fagocitária, utilizando-se  $2,5 \times 10^5$  leveduras não sensibilizadas por escavação. A - Índice fagocitário; B - Média de leveduras ingeridas/aderidas por monócito; C - Percentual de monócitos envolvidos na fagocitose. Em A:  $p=0,818$ . Em B:  $p=0,736$ . Em C:  $p=0,731$ . Teste t pareado.

#### **4.1.13 - Análise comparativa da influência do tratamento *in vitro* de monócitos de indivíduos normais com zidovudina, lamivudina, efavirenz e lopinavir/ritonavir isolados ou associados sobre a fagocitose pelos receptores para padrões moleculares de patógenos**

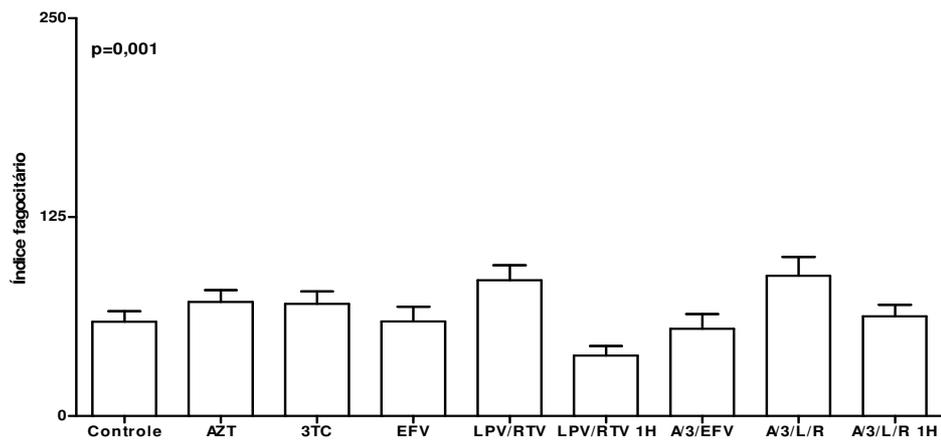
Verificou-se diferença significativa da média  $\pm$  DP do índice fagocitário ( $p=0,001$ , ANOVA), da média de leveduras ingeridas/aderidas por monócito ( $p=0,006$ , ANOVA) e do percentual de monócitos envolvidos na fagocitose ( $p=0,008$ , ANOVA) entre os grupos estudados (**Figura 22**).

Notou-se que o grupo tratado com lopinavir/ritonavir por 60 minutos apresentou menor média  $\pm$  DP do índice fagocitário do que o grupo que recebeu a associação zidovudina, lamivudina e lopinavir/ritonavir por 30 minutos ( $p<0,01$ , teste de Student Newman-Keuls) ou lopinavir/ritonavir por 30 minutos ( $p<0,01$ , teste de Student Newman-Keuls).

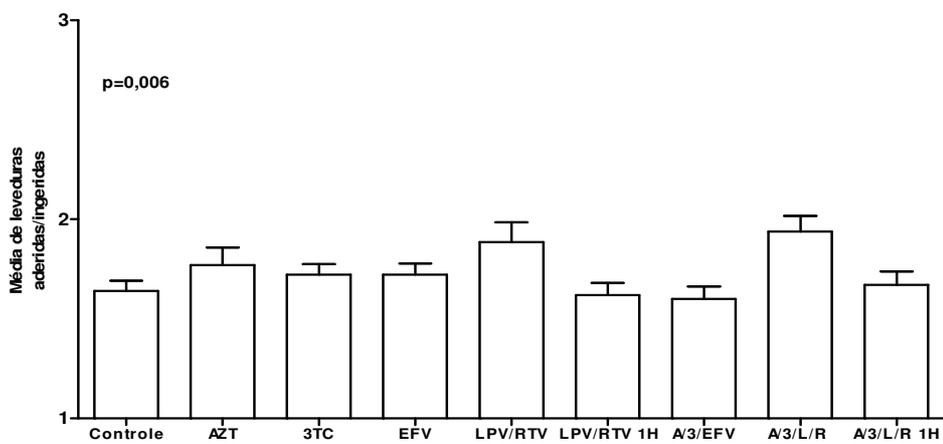
Observou-se ainda que a média  $\pm$  DP do número de leveduras aderidas/ingeridas por monócito do grupo exposto a zidovudina, lamivudina e lopinavir/ritonavir por 30 minutos foi maior que a média  $\pm$  DP do grupo tratado com zidovudina, lamivudina e efavirenz ( $p<0,05$ , teste de Student Newman-Keuls) ou com lopinavir/ritonavir por 60 minutos ( $p<0,05$ , teste de student Newman-Keuls).

A média  $\pm$  DP do percentual de monócitos envolvidos na fagocitose foi menor no grupo tratado com lopinavir/ritonavir por 60 minutos do que no exposto a zidovudina, lamivudina e lopinavir/ritonavir por 30 minutos ( $p<0,05$ , teste de Student Newman-Keuls), lopinavir/ritonavir por 30 minutos ( $p<0,01$ ,

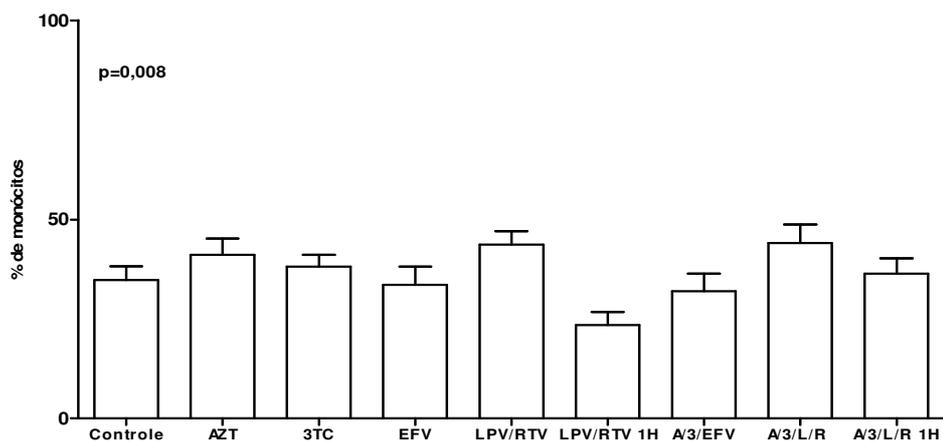
teste de Student Newman-Keuls) e zidovudina ( $p < 0,05$ , teste de Student Newman-Keuls) (**Figura 22**).



A



B

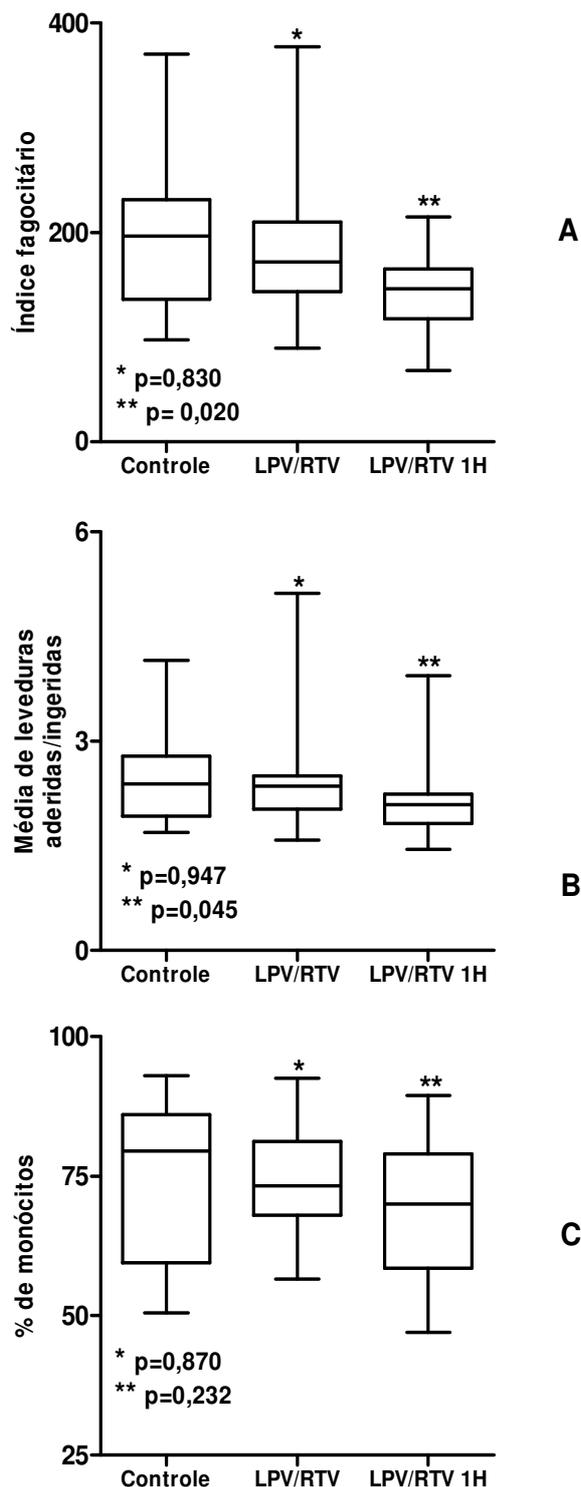


C

**Figura 22.** Comparação entre o índice fagocitário, média de leveduras ingeridas/aderidas por monócito e percentual de monócitos envolvidos na fagocitose de leveduras não sensibilizadas entre os grupos estudados. Em A, B e C houve diferença estatística entre os índices fagocitários ( $p=0,001$ ), médias de leveduras ingeridas/aderidas por monócito ( $p=0,006$ ) e percentual de monócitos envolvidos na fagocitose ( $p=0,008$ ). ANOVA. IF de LPV/RTV 1H < A3/L/R e < LPV/RTV, média de leveduras de A3/L/R > A3/EFV e > LPV/RTV 1H, percentual de monócitos de LPV/RTV 1H < A3/L/R, < LPV/RTV e < AZT ( $p<0,05$ , teste de Student Newman-Keuls).

#### **4.1.14 - Influência do tratamento *in vitro* de monócitos de indivíduos normais com lopinavir/ritonavir sobre a fagocitose pelos receptores para opsoninas**

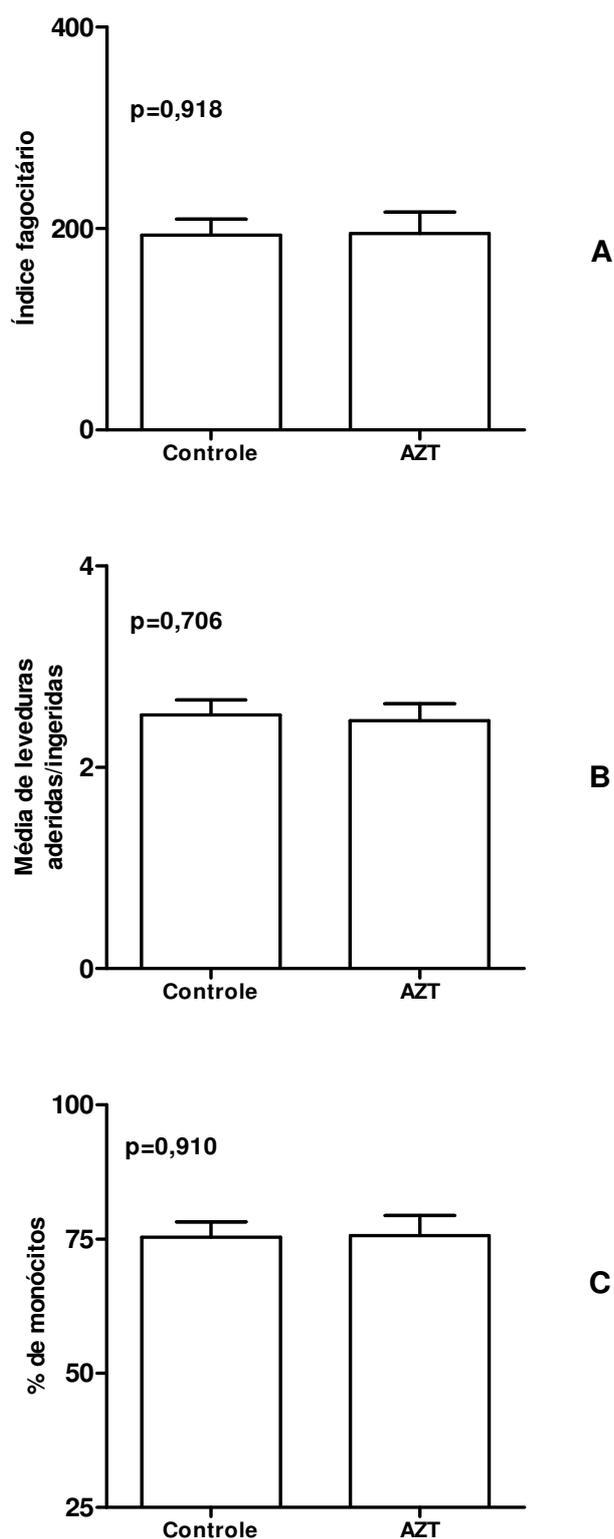
O tratamento com lopinavir/ritonavir durante 30 minutos não causou alterações significativas da capacidade fagocitária de monócitos por meio dos receptores para opsoninas. Já os monócitos incubados por 60 minutos apresentaram redução significativa da mediana do índice fagocitário de 197,0 para 146,0 ( $p=0,085$ , teste de Wilcoxon). Esta diminuição deveu-se a redução da mediana do número de leveduras aderidas/ingeridas por monócito de 2,4 no grupo controle para 2,1 no grupo tratado com lopinavir/ritonavir ( $p=0,045$ , pelo teste de Wilcoxon). Não houve diferença significativa entre as medianas do percentual de monócitos envolvidos na fagocitose do grupo controle e do tratado com lopinavir/ritonavir por 60 minutos ( $p=0,232$ , teste t pareado) **(Figura 23)**.



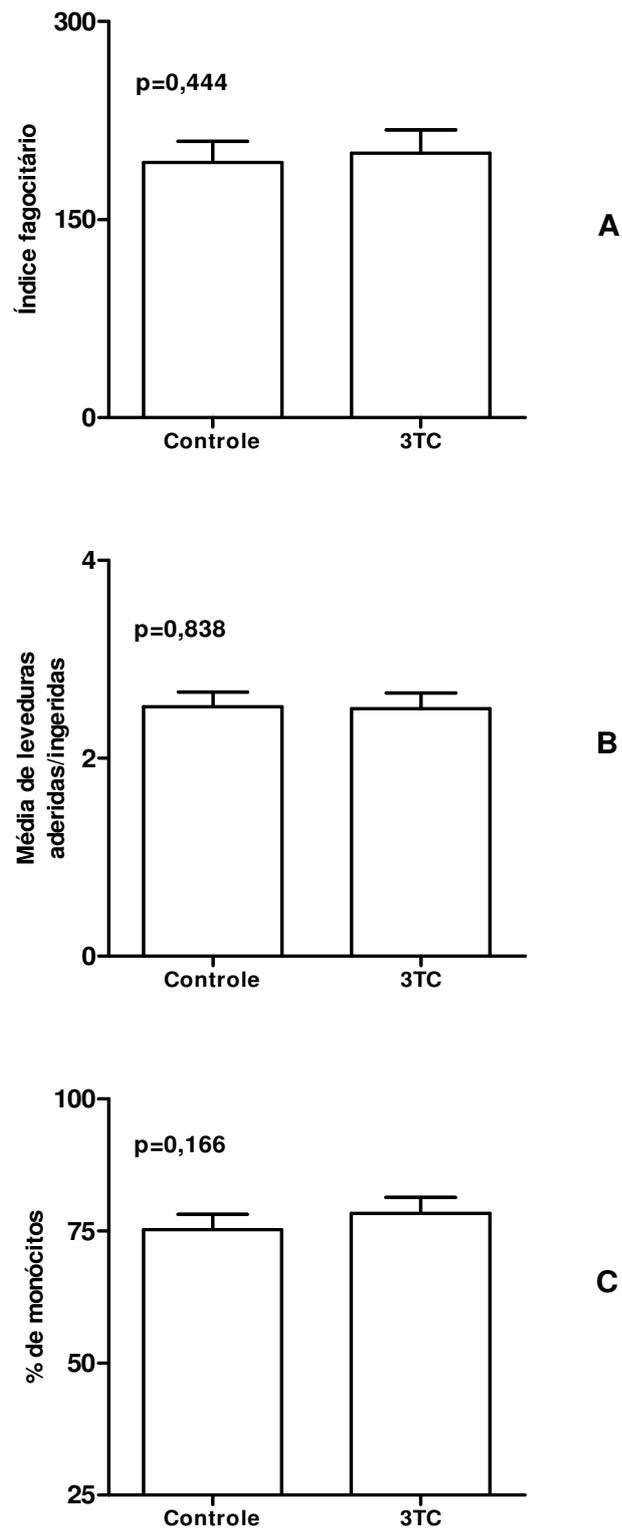
**Figura 23:** Influência do tratamento *in vitro* de monócitos com lopinavir/ritonavir por 30 (\*) e 60 (\*\*) minutos sobre a capacidade fagocitária, utilizando-se  $2,5 \times 10^5$  leveduras sensibilizadas por escavação. A - Índice fagocitário; B - Média de leveduras ingeridas/aderidas por monócito; C - Percentual de monócitos envolvidos na fagocitose. Em A\*: p=0,830, teste de Wilcoxon. Em B\*: p=0,947, teste de Wilcoxon. Em C\*: p=0,870, teste t pareado. Em A\*\*: Diminuição do índice fagocitário (p=0,020, teste t pareado). Em B\*\*: Diminuição da média de leveduras ingeridas/aderidas por monócito (p=0,045, teste de Wilcoxon). Em C\*\*: p=0,232, teste t pareado.

**4.1.15 - Influência do tratamento *in vitro* de monócitos de indivíduos normais com zidovudina, lamivudina, efavirenz e das associações compostas por zidovudina, lamivudina, efavirenz ou lopinavir/ritonavir sobre a fagocitose pelos receptores para opsoninas**

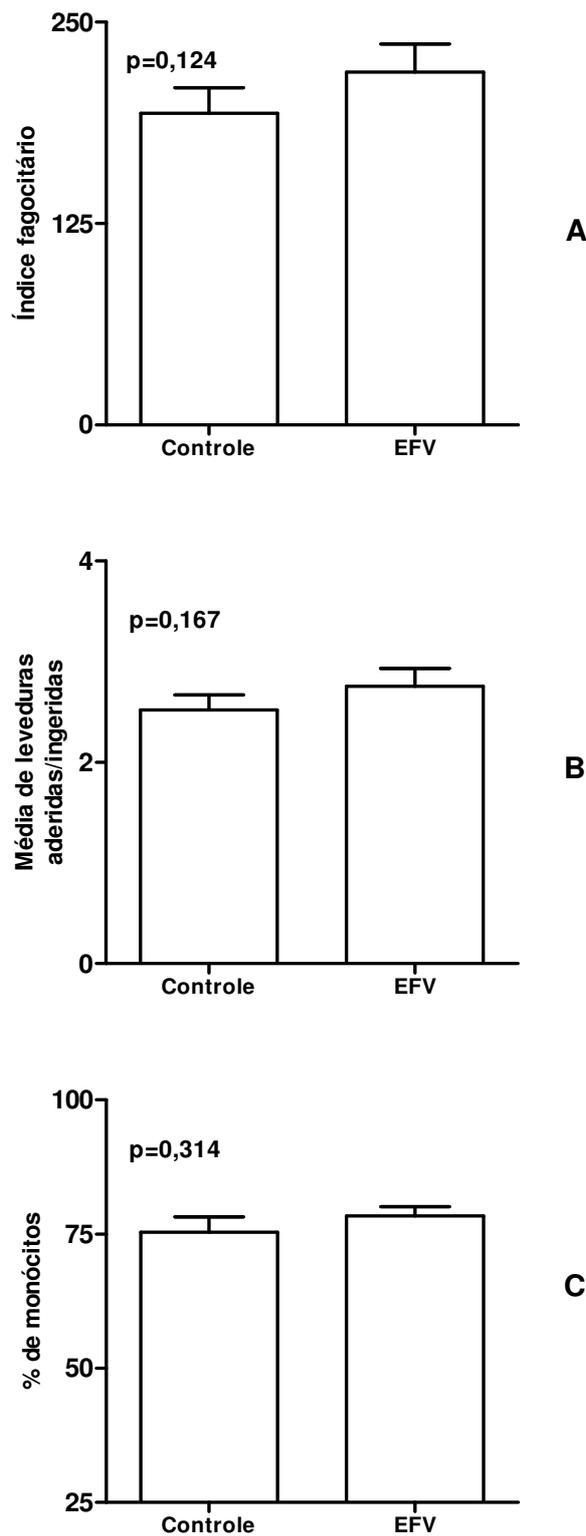
Os medicamentos zidovudina (**Figura 24**), lamivudina (**Figura 25**), efavirenz (**Figura 26**) e as associações da zidovudina e da lamivudina com o efavirenz (**Figura 27**) ou com o lopinavir/ritonavir (**Figura 28**) não alteraram a capacidade fagocitária de monócitos por meio dos receptores para opsoninas.



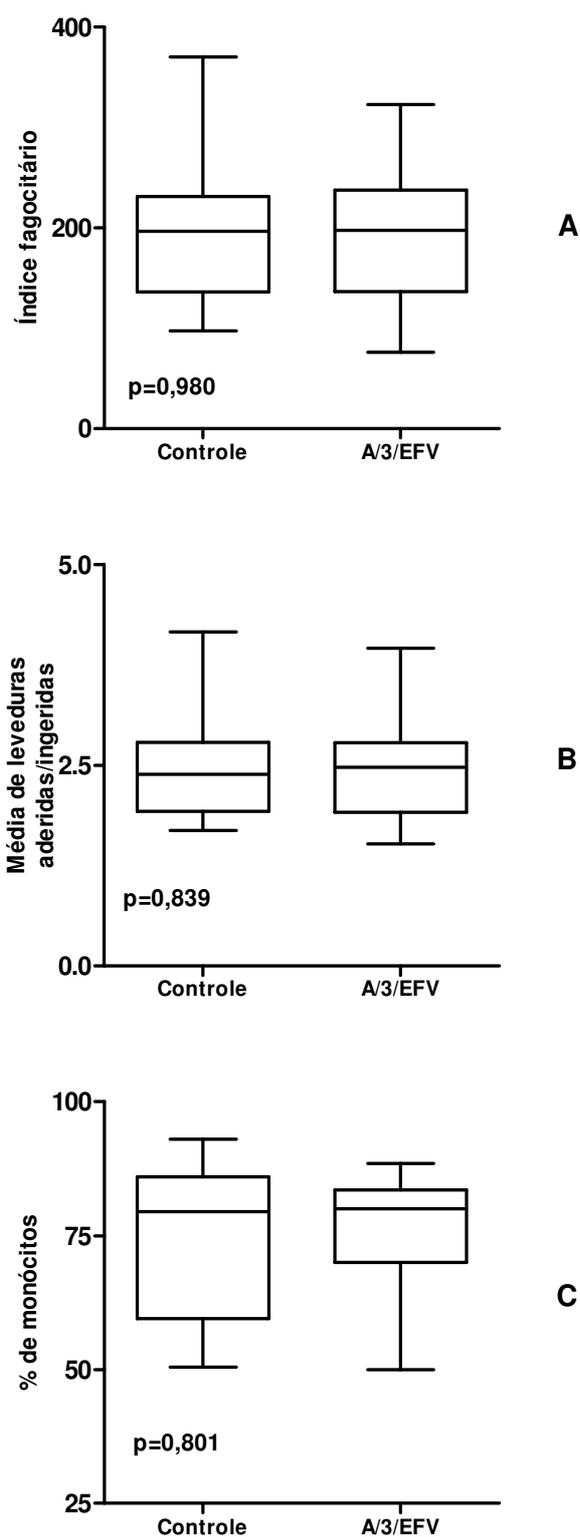
**Figura 24:** Influência do tratamento *in vitro* de monócitos com zidovudina por 30 minutos sobre a capacidade fagocitária, utilizando-se  $2,5 \times 10^5$  leveduras sensibilizadas por escavação. A - Índice fagocitário; B - Média de leveduras ingeridas/aderidas por monócito; C - Percentual de monócitos envolvidos na fagocitose. Em A:  $p=0,918$ . Em B:  $p=0,706$ . Em C:  $p=0,910$ . Teste t pareado.



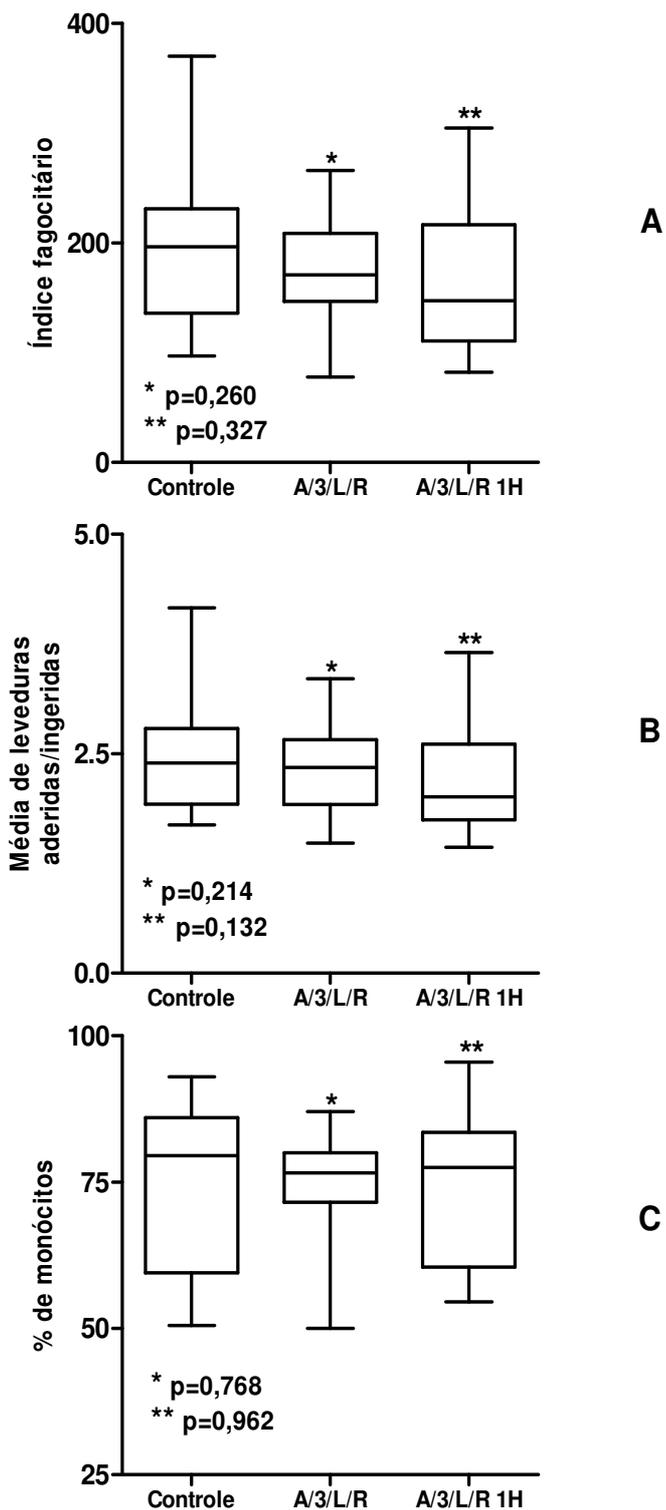
**Figura 25:** Influência do tratamento *in vitro* de monócitos com lamivudina por 30 minutos sobre a capacidade fagocitária, utilizando-se  $2,5 \times 10^5$  leveduras sensibilizadas por escavação. A - Índice fagocitário; B - Média de leveduras ingeridas/aderidas por monócito; C - Percentual de monócitos envolvidos na fagocitose. Em A:  $p=0,444$ . Em B:  $p=0,838$ . Em C:  $p=0,166$ . Teste t pareado.



**Figura 26:** Influência do tratamento *in vitro* de monócitos com efavirenz por 30 minutos sobre a capacidade fagocitária, utilizando-se  $2,5 \times 10^5$  leveduras sensibilizadas por escavação. A - Índice fagocitário; B - Média de leveduras ingeridas/aderidas por monócito; C - Percentual de monócitos envolvidos na fagocitose. Em A:  $p=0,124$ . Em B:  $p=0,167$ . Em C:  $p=0,314$ . Teste t pareado.



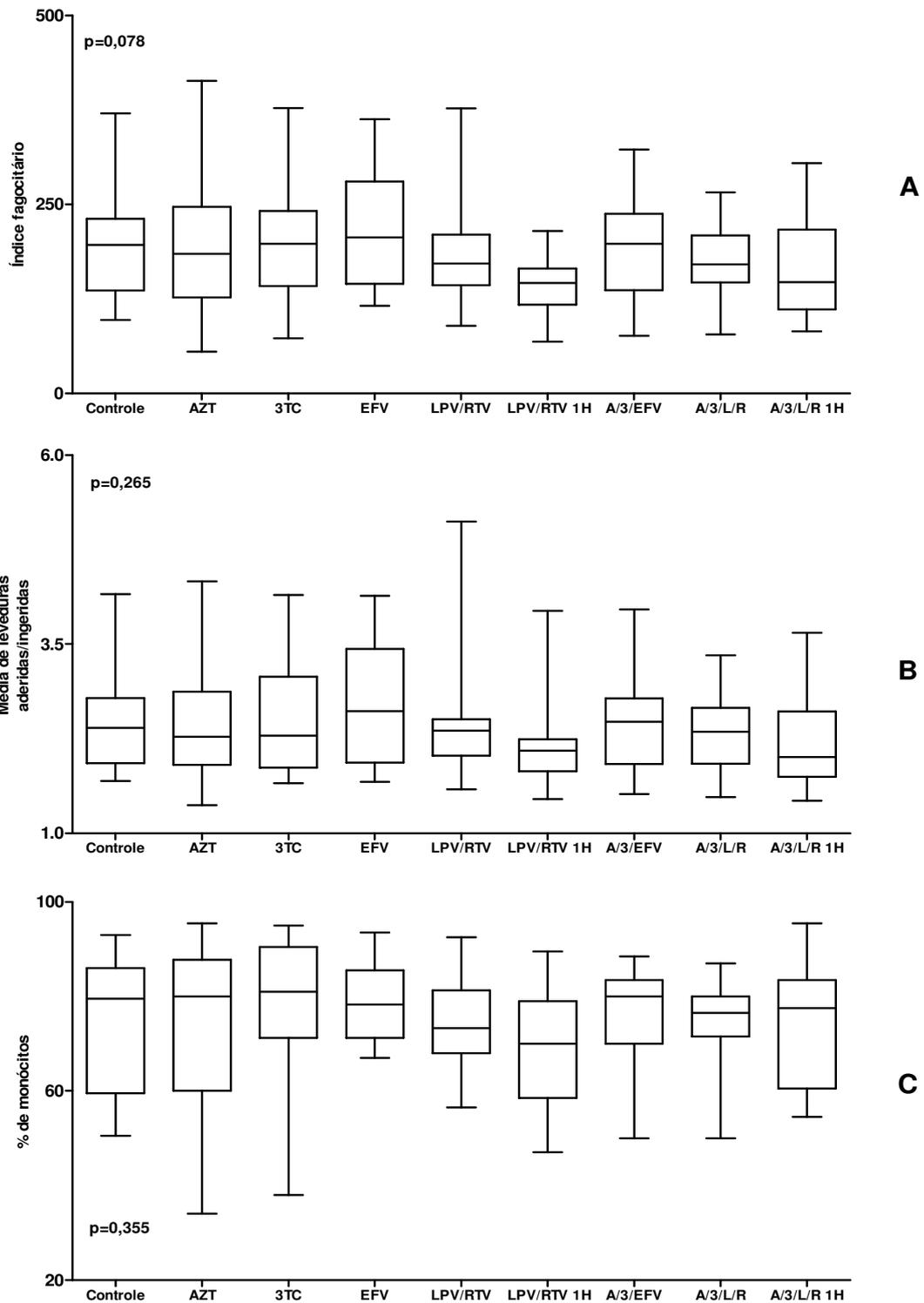
**Figura 27:** Influência do tratamento *in vitro* de monócitos com a associação zidovudina, lamivudina e efavirenz por 30 minutos sobre a capacidade fagocitária, utilizando-se  $2,5 \times 10^5$  leveduras sensibilizadas por escavação. A - Índice fagocitário; B - Média de leveduras ingeridas/aderidas por monócito; C - Percentual de monócitos envolvidos na fagocitose. Em A:  $p=0,980$ , teste t pareado. Em B:  $p=0,839$  teste t pareado. Em C:  $p=0,801$ , teste de Wilcoxon.



**Figura 28:** Influência do tratamento *in vitro* de monócitos com a associação zidovudina, lamivudina e lopinavir/ritonavir por 30 (\*) e 60 (\*\*) minutos sobre a capacidade fagocitária, utilizando-se  $2,5 \times 10^5$  leveduras sensibilizadas por escavação. A - Índice fagocitário; B - Média de leveduras ingeridas/aderidas por monócito; C - Percentual de monócitos envolvidos na fagocitose. Em A\*: p=0,260, teste t pareado. Em B\*: p=0,214, teste t pareado. Em C\*: p=0,768, teste de Wilcoxon. Em A\*\*: p=0,327. Em B\*\*: p=0,132. Em C\*\*: p=0,962. Teste t pareado.

#### **4.1.16 - Análise comparativa da influência do tratamento *in vitro* de monócitos de indivíduos normais com zidovudina, lamivudina, efavirenz e lopinavir/ritonavir isolados ou associados sobre a fagocitose pelos receptores para opsoninas**

Quando se comparou os grupos estudados, observou-se uma tendência a respostas diferentes dos índices fagocitários ( $p=0,078$  , Kruskal-Wallis). Não houve diferença significativa das medianas do número de leveduras ingeridas/aderidas por monócito ( $p=0,265$ , Kruskal-Wallis) e do percentual de monócitos envolvidos na fagocitose ( $p=0,355$ , Kruskal-Wallis) (**Figura 29**). Observou-se que a mediana do índice fagocitário do grupo tratado com efavirenz foi significativamente maior que o exposto ao lopinavir/ritonavir por 60 minutos ( $p<0,05$ , teste de Dunn) (**Figura 29**).



**Figura 29.** Comparação entre o índice fagocitário, média de leveduras ingeridas/aderidas por monócito e percentual de monócitos envolvidos na fagocitose de leveduras sensibilizadas entre os grupos estudados. Em A houve tendência a respostas diferentes entre os índices fagocitários ( $p=0,078$ , Kruskal-Wallis). Em B e C não houve diferença estatística entre as médias de leveduras ingeridas/aderidas por monócito ( $p=0,265$ , Kruskal-Wallis) e percentual de monócitos envolvidos na fagocitose ( $p=0,355$ , Kruskal-Wallis). IF do EFV > LPV/RTV 1H ( $p<0,05$ , teste de Dunn).

#### **4.2 - Influência do tratamento de fagócitos de indivíduos normais com zidovudina, lamivudina, efavirenz e lopinavir/ritonavir isolados ou associados sobre a produção de radicais de oxigênio**

Para investigar se o tratamento, *in vitro*, dos fagócitos de indivíduos normais com os medicamentos mencionados interfere na capacidade destas células produzirem radicais de oxigênio utilizou-se o teste do *nitroblue tetrazolium* (NBT), uma técnica que permite avaliar por microscopia óptica o percentual de células que reduziram o NBT, corante amarelo e solúvel que na presença do ânion superóxido torna-se um composto insolúvel e de coloração azulada. Foi feita a determinação do percentual de redução do NBT antes e após o tratamento com os antiretrovirais. Estudou-se tanto a possibilidade de interferência sobre a produção basal de radicais de oxigênio (NBT basal) quanto sobre a produção estimulada por *Saccharomyces cerevisiae* (NBT estimulado).

#### **4.2.1 - Influência do tratamento *in vitro* de fagócitos de indivíduos normais com zidovudina sobre o percentual de redução do *nitroblue tetrazolium* basal e estimulado**

A exposição a 1,64 µg/ml de zidovudina não alterou o percentual de células que reduziram o NBT basal. Entretanto, quando os fagócitos tratados com zidovudina foram estimulados com o antígeno, observou-se um decréscimo significativo da média  $\pm$  DP do percentual de células que reduziram NBT de  $83,3 \pm 8,9\%$  para  $77,5 \pm 13,4\%$  ( $p=0,027$ , teste t pareado) (**Figura 30**).

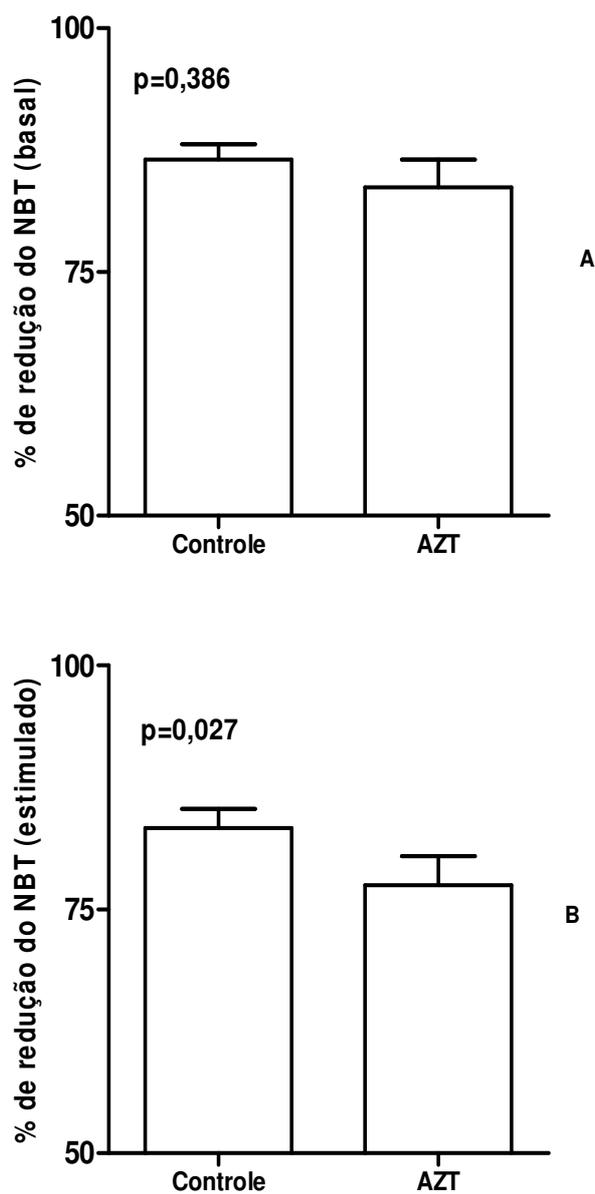


Figura 30. Influência do tratamento *in vitro* de fagócitos de indivíduos normais com zidovudina por 45 minutos sobre o percentual de redução do *nitroblue tetrazolium*. A - NBT basal; B - NBT estimulado. Em A: Não influenciou o percentual de fagócitos que reduziram o NBT ( $p=0,386$ ). Em B: Diminuição do percentual de fagócitos que reduziram o NBT ( $p=0,027$ ). Teste t pareado.

#### **4.2.2 - Influência do tratamento *in vitro* de fagócitos de indivíduos normais com lamivudina sobre o percentual de redução do *nitroblue tetrazolium* basal e estimulado**

A lamivudina deprimiu a média  $\pm$  DP da produção estimulada do ânion superóxido de  $83,3\% \pm 8,9\%$  para  $75,1\% \pm 14,6\%$  ( $p=0,004$ , teste t pareado) e tendeu a diminuir a média  $\pm$  DP da produção basal deste ânion ( $p=0,071$ , teste t pareado) (**Figura 31**).

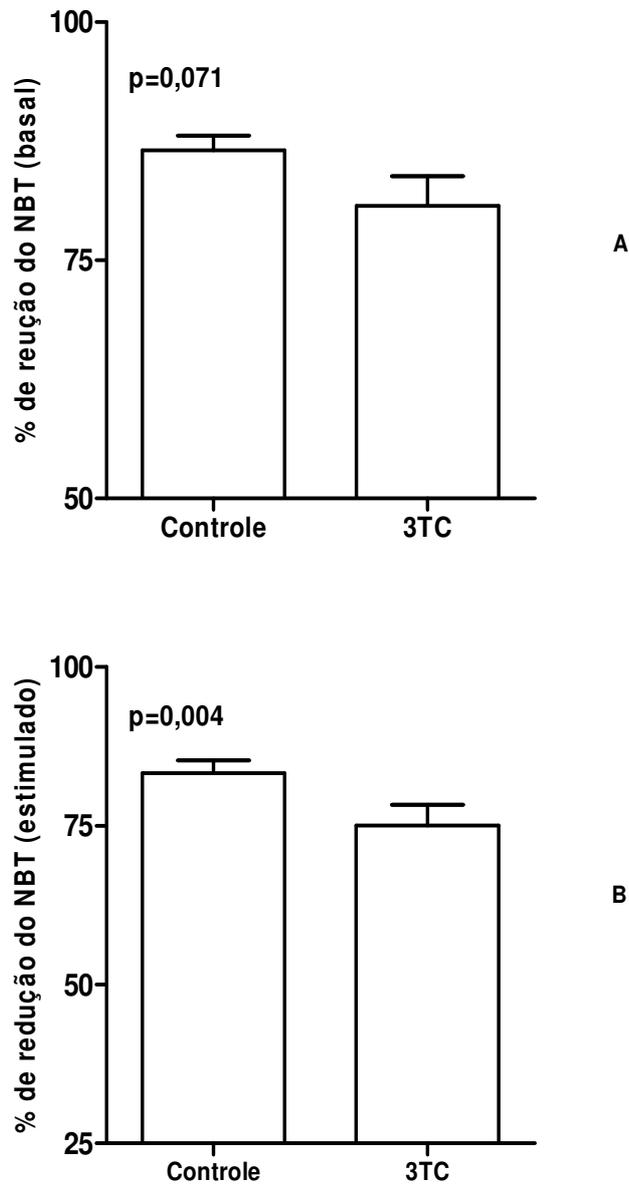


Figura 31. Influência do tratamento *in vitro* de fagócitos de indivíduos normais com lamivudina por 45 minutos sobre o percentual de redução do *nitroblue tetrazolium*. A - NBT basal; B - NBT estimulado. Em A: Tendência a diminuição do percentual de fagócitos que reduziram o NBT ( $p=0,071$ ). Em B: Diminuição do percentual de fagócitos que reduziram o NBT ( $p=0,004$ ). Teste t pareado.

#### **4.2.3 - Influência do tratamento *in vitro* de fagócitos de indivíduos normais com efavirenz sobre o percentual de redução do *nitroblue tetrazolium* basal e estimulado**

O efavirenz não alterou os percentuais de fagócitos que reduziram o NBT basal e estimulado (**Figura 32**).

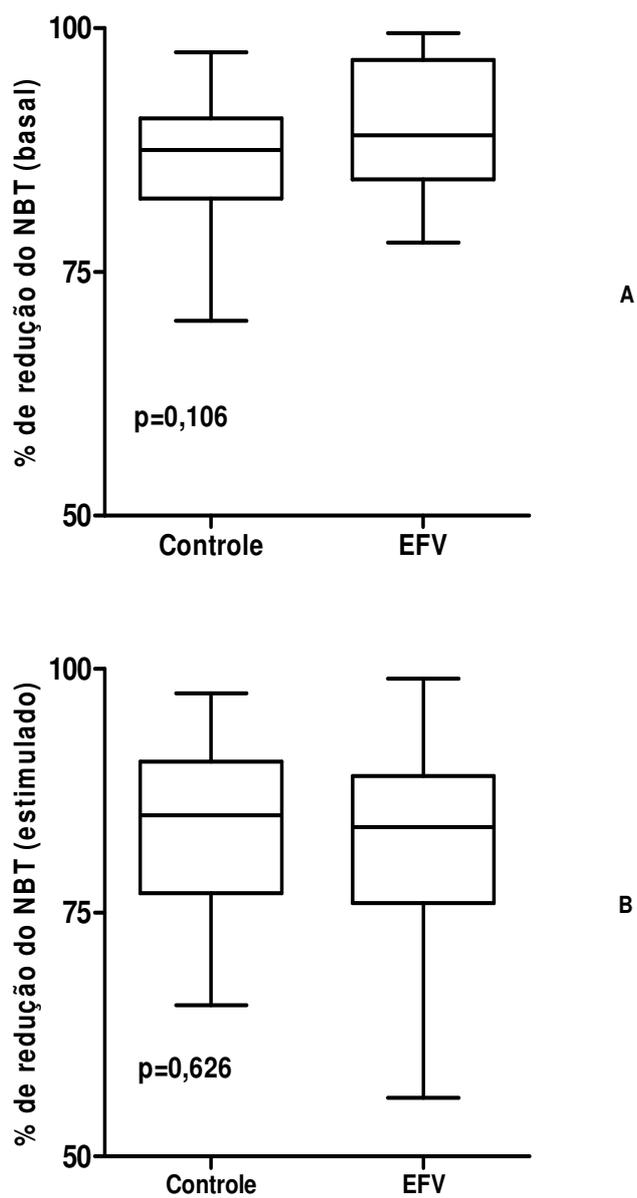


Figura 32. Influência do tratamento *in vitro* de fagócitos de indivíduos normais com efavirenz por 45 minutos sobre o percentual de redução do *nitroblue tetrazolium*. A - NBT basal; B - NBT estimulado. Em A ( $p=0,106$ , teste de Wilcoxon) e B ( $p=0,626$ , teste t pareado) não houve influência sobre o percentual de fagócitos que reduziram o NBT.

#### **4.2.4 - Influência do tratamento *in vitro* de fagócitos de indivíduos normais com lopinavir/ritonavir sobre o percentual de redução do *nitroblue tetrazolium* basal e estimulado**

Os fagócitos expostos ao lopinavir/ritonavir apresentaram diminuição de 21,3% da média  $\pm$  DP do percentual de redução do NBT basal ( $p=0,0007$ , teste t pareado) e de 15,1% da média  $\pm$  DP do percentual de redução do NBT estimulado ( $p=0,0001$ , teste t pareado) em relação aos seus respectivos controles (**Figura 33**).

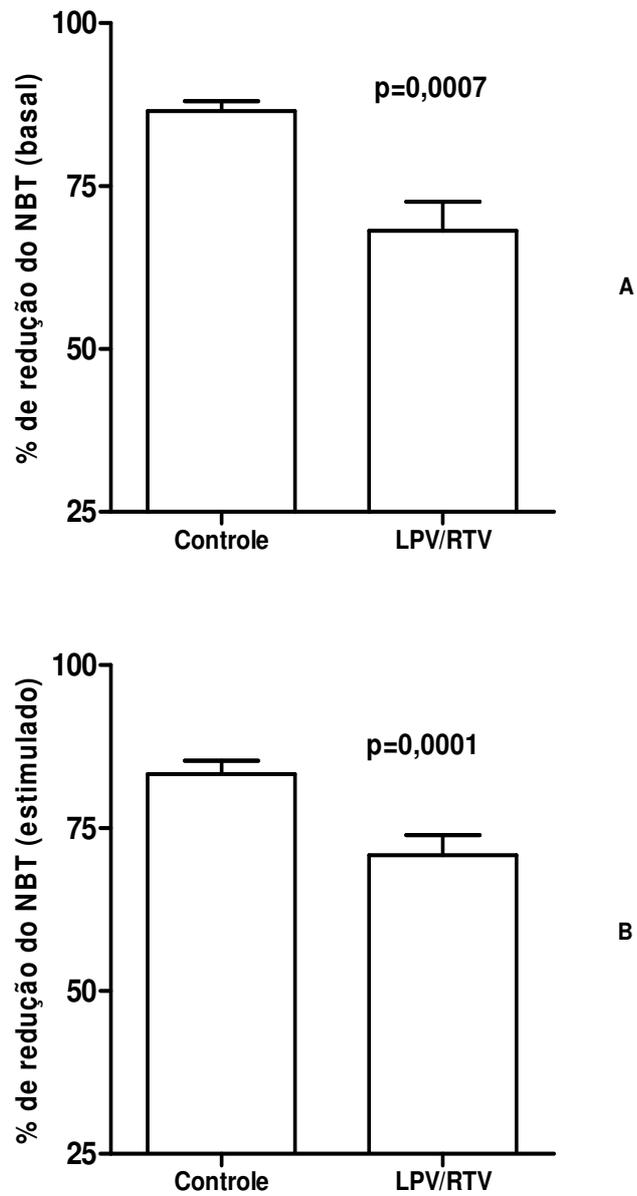


Figura 33. Influência do tratamento *in vitro* de fagócitos de indivíduos normais com lopinavir/ritonavir por 45 minutos sobre o percentual de redução do *nitroblue tetrazolium*. A - NBT basal; B - NBT estimulado. Em A ( $p=0,0007$ ) e B ( $p=0,0001$ ) houve diminuição do percentual de fagócitos que reduziram o NBT. Teste t pareado.

#### **4.2.5 - Influência do tratamento *in vitro* de fagócitos de indivíduos normais com zidovudina, lamivudina e efavirenz sobre o percentual de redução do *nitroblue tetrazolium* basal e estimulado**

A associação zidovudina, lamivudina e efavirenz não alterou os percentuais de fagócitos que reduziram o NBT basal e estimulado (**Figura 34**).

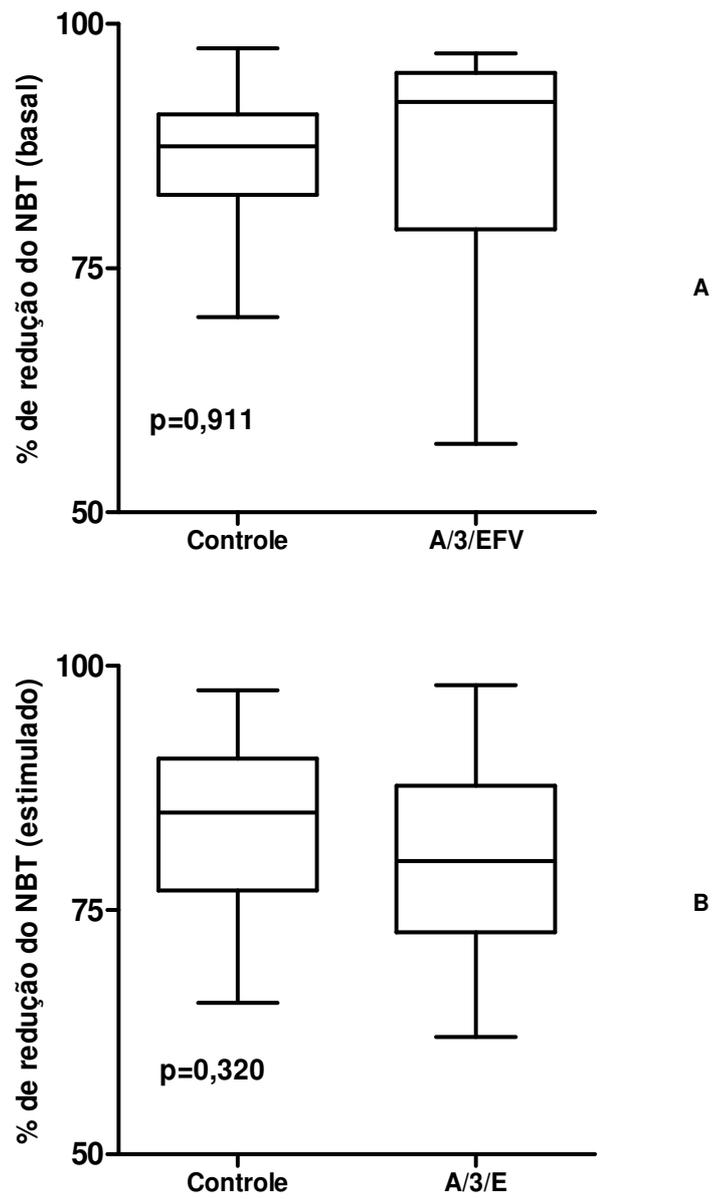


Figura 34. Influência do tratamento *in vitro* de fagócitos de indivíduos normais com zidovudina, lamivudina e efavirenz por 45 minutos sobre o percentual de redução do *nitroblue tetrazolium*. A - NBT basal; B - NBT estimulado. Em A:  $p=0,911$ , teste de Wilcoxon. Em B:  $p=0,320$ , teste t pareado.

#### **4.2.6 - Influência do tratamento *in vitro* de fagócitos de indivíduos normais com zidovudina, lamivudina e lopinavir/ritonavir sobre o percentual de redução do *nitroblue tetrazolium* basal e estimulado**

Estes medicamentos promoveram um decréscimo expressivo da média  $\pm$  DP de  $86,5 \pm 6,9\%$  para  $69,5 \pm 15,5\%$  ( $p < 0,0001$ , teste t pareado) do percentual de fagócitos que reduziram o NBT basal e da média  $\pm$  DP de  $83,3 \pm 8,8\%$  para  $69,4 \pm 15,0\%$  ( $p = 0,0001$ , teste t pareado) do percentual dos que reduziram o NBT estimulado (**Figura 35**).

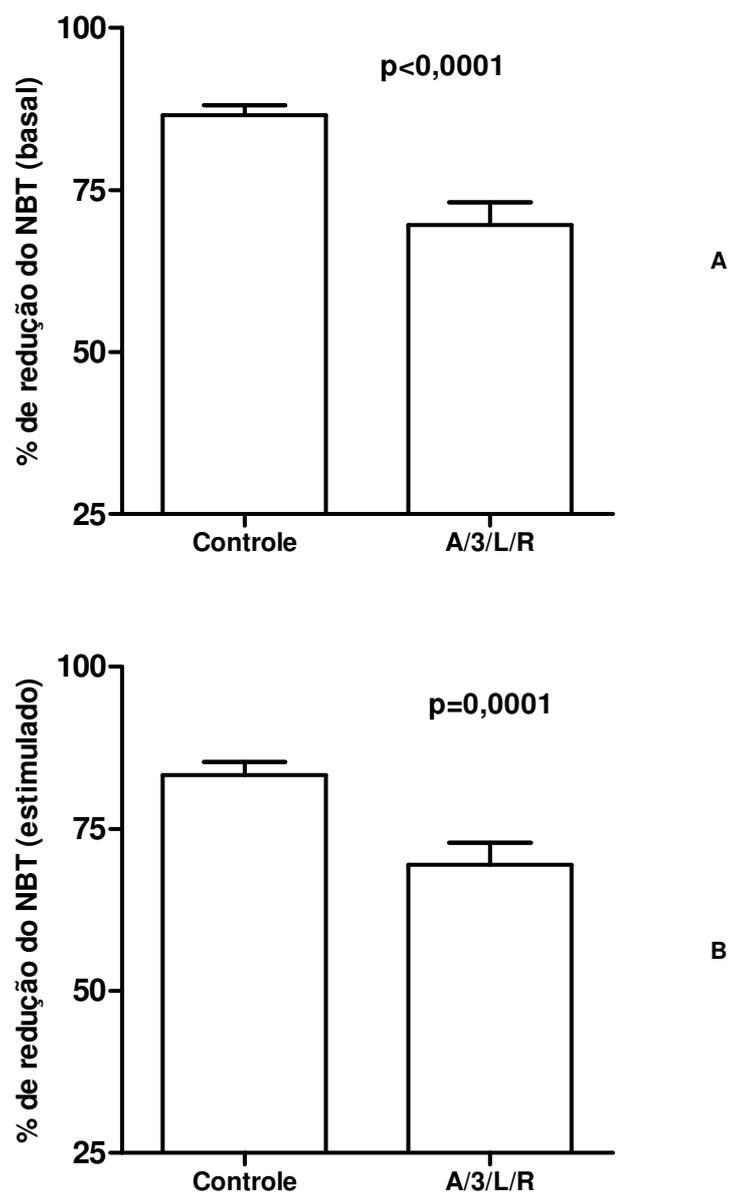


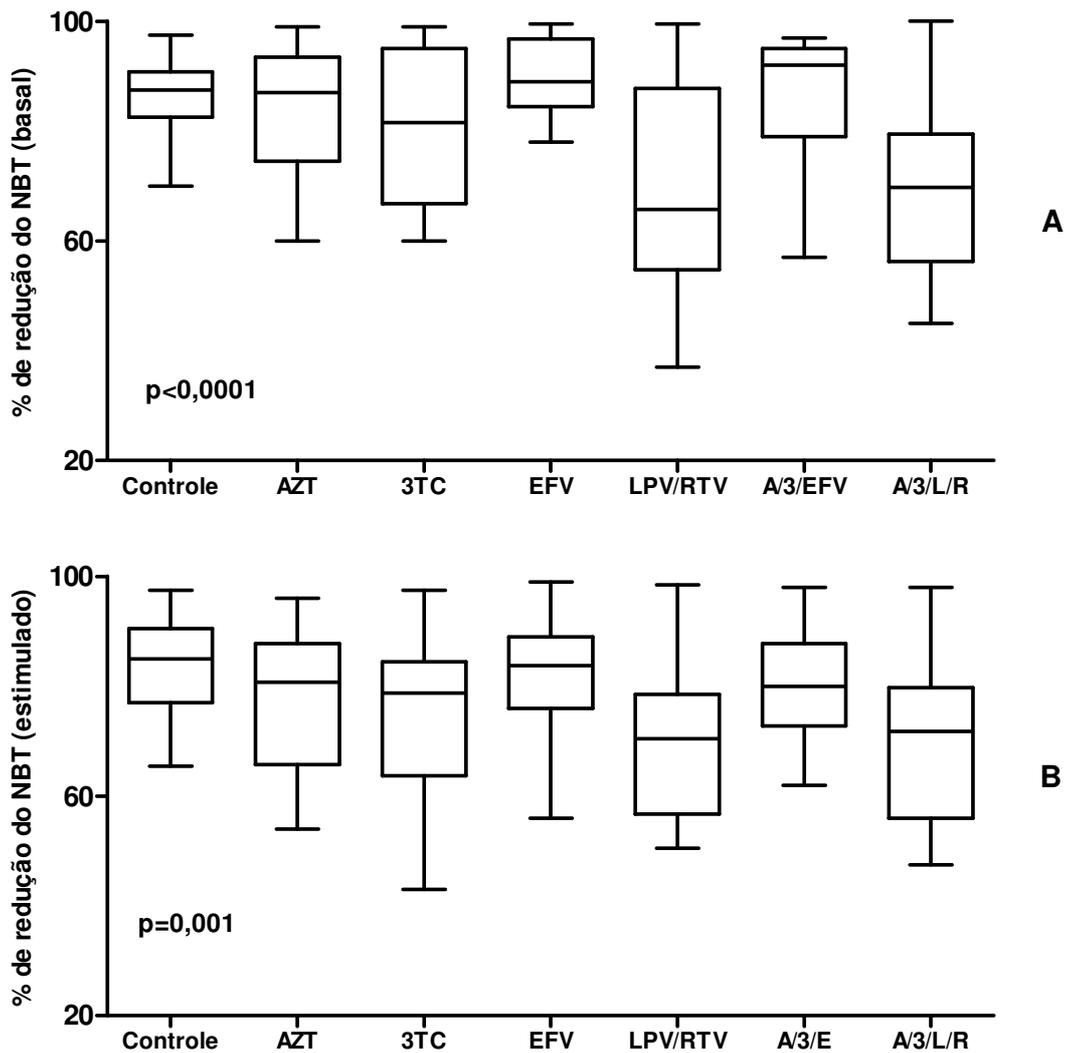
Figura 35. Influência do tratamento *in vitro* de fagócitos de indivíduos normais com zidovudina, lamivudina e lopinavir/ritonavir por 45 minutos sobre o percentual de redução do *nitroblue tetrazolium*. A - NBT basal; B - NBT estimulado. Em A ( $p < 0,0001$ ) e em B ( $p = 0,0001$ ) houve diminuição do percentual de fagócitos que reduziram o NBT. Teste t pareado.

#### **4.2.7 - Análise comparativa da influência do tratamento *in vitro* de fagócitos de indivíduos normais com zidovudina, lamivudina, efavirenz e lopinavir/ritonavir isolados ou associados sobre o percentual de redução do *nitroblue tetrazolium* basal e estimulado**

Observou-se diferenças nas medianas do percentual de células que reduziram o NBT basal ( $p=0,001$ , Kruskal-Wallis) e nas médias  $\pm$  DP do NBT estimulado ( $p<0,0001$ , ANOVA) entre os grupos estudados (**Figura 36**).

A mediana do percentual de redução do NBT basal foi menor no grupo tratado com zidovudina, lamivudina e lopinavir/ritonavir do que no exposto ao efavirenz ( $p<0,001$ , teste de Dunn), do que a associação zidovudina, lamivudina e efavirenz ( $p<0,05$ , teste de Dunn) e do que o grupo controle ( $p<0,05$ , teste de Dunn). A mediana do percentual de redução do NBT basal pela associação lopinavir/ritonavir também foi menor do que para o grupo tratado com EFV ( $p<0,05$ , teste de Dunn).

Com relação ao NBT estimulado, verificou-se que o grupo que recebeu zidovudina, lamivudina e lopinavir/ritonavir por 30 minutos apresentou média  $\pm$  DP do percentual de redução do NBT menor do que o controle ( $p<0,05$ , teste de Student Newman-Keuls) e do que os tratados com efavirenz ( $p<0,05$ , teste de Student Newman-Keuls) e com zidovudina, lamivudina e efavirenz ( $p<0,05$ , teste de Student Newman-Keuls). Observou-se também decréscimo da média  $\pm$  DP do percentual de redução do NBT após estímulo entre o grupo que recebeu lopinavir/ritonavir por 30 minutos e o controle ( $p<0,05$ , teste de Student Newman-Keuls) e o grupo tratado com efavirenz ( $p<0,05$ , teste de Student Newman-Keuls).



**Figura 36.** Comparação do percentual de fagócitos que reduziram o NBT basal e estimulado entre os grupos estudados e seus respectivos controles. Em A: Houve diferença estatística entre o percentual de fagócitos que reduziram o NBT basal ( $p < 0,0001$ , Kruskal-Wallis). Em B: Houve diferença estatística entre o percentual de fagócitos que reduziram o NBT estimulado ( $p = 0,001$ , ANOVA). NBT basal: A3/L/R < controle, < EFV e < A3/E ( $p < 0,05$ , teste de Dunn). NBT basal: LPV/RTV < EFV ( $p < 0,05$ , teste de Dunn). NBT estimulado: A3/L/R < controle, < EFV e < A3/EFV ( $p < 0,05$ , teste de Student Newman-Keuls). NBT estimulado: LPV/RTV < controle e < EFV ( $p < 0,05$ , teste de Student Newman-Keuls).

# **DISCUSSÃO**

Neste trabalho foi avaliada a influência *in vitro* dos antiretrovirais zidovudina, lamivudina, efavirenz e lopinavir/ritonavir isoladamente e das associações da zidovudina e lamivudina com o efavirenz ou com o lopinavir/ritonavir sobre a capacidade fagocitária e produção de ânions superóxido por neutrófilos e monócitos, que são células que participam da defesa inata do organismo.

A fagocitose é o principal mecanismo de defesa da imunidade inata e se caracteriza pelo englobamento de partículas. O contato fagócito-partícula é acompanhado de sinalização intracelular que desencadeia diversos processos, como rearranjo do citoesqueleto do fagócito, alterações no tráfico de moléculas pela membrana, ativação de mecanismos microbicidas e produção de quimiocinas e citocinas com propriedades pró e antiinflamatórias (Underhill e Aderem 1999; Witko-Sarsat e cols. 2000; Underhill e Ozinsky 2002). Ocorre por meio dos receptores para padrões moleculares de patógenos, que interagem diretamente com as partículas a serem fagocitadas, ou pelos receptores para opsoninas, que são moléculas que recobrem as partículas e medeiam à ligação dos antígenos a receptores fagocitários específicos (Abbas 2005).

Os fagócitos possuem múltiplos receptores para padrões moleculares de patógenos tais como os receptores para manose e glucana, de limpeza e semelhantes ao Toll (Offek e cols. 1995; Janeway & Medzhitov 2002; Underhill 2003; Taylor e cols. 2005) e para opsoninas tais como os receptores para lectina de ligação a manose, proteína amilóide A, fragmentos do complemento e fração cristalizável da imunoglobulina G, que cooperam para a otimização da fagocitose (Underhill e Aderem 1999; Witko-Sarsat e cols. 2000; Underhill e Ozinsky 2002).

Fagocitose de *Saccharomyces cerevisiae* por neutrófilos e monócitos pode ser efetuada pela glicoproteína dectina-1 que reconhece diretamente glucana  $\beta$  presente na superfície da levedura (Giaimis e cols. 1993; Underhill e Ozinsky 2002; Underhill 2003; Brown e Gordon 2005; Taylor e cols. 2005). No entanto, dectina-1 não dispara sinalização para produção de citocinas pró-inflamatórias tais como FNT- $\alpha$  e IL-12 sendo necessário para uma resposta antimicrobiana apropriada, o engajamento concomitante dos receptores semelhantes ao Toll 2 e 6 (Underhill e Ozinsky 2002; Underhill 2003; Gartner e cols. 2003; Brown e Gordon 2005).

Monócitos e neutrófilos, para realizar a morte microbiana, produzem ânion superóxido ( $O_2^-$ ) que é um reativo de oxigênio gerado pela ativação da NADPH oxidase, enzima que catalisa a transferência de um elétron do NADPH para o oxigênio molecular (Babior 1999, Segal 2005). Este ânion é utilizado pelos fagócitos para a produção de outras moléculas microbicidas tais como peróxido de hidrogênio, hidroxila e halídeos oxidados (Segal 2005). Parte do superóxido celular é gerado nas mitocôndrias a partir da transferência de elétrons da cadeia respiratória para o oxigênio molecular (Turrens 2003).

Neste trabalho notou-se que o tratamento *in vitro* de neutrófilos com EFV determinou tanto um aumento do percentual de neutrófilos envolvidos na fagocitose pelos receptores para padrões moleculares de patógenos (Fig. 2) quanto para opsoninas (Fig. 9). Entretanto, este aumento foi mais evidente quando analisamos a fagocitose por rPMP, pois houve aumento concomitante do índice fagocitário (Fig. 2). Estes resultados sugerem que o EFV possa aumentar a capacidade quimiotática dos neutrófilos. O mecanismo associado a esta alteração não está esclarecido, entretanto pode estar relacionado à

indução do estresse oxidativo nos neutrófilos por esta droga, pois Hulgán e cols. (2003) demonstraram uma relação entre o uso do EFV e níveis elevados de isoprostanas  $F_2$ , uma molécula semelhante à prostaglandina  $F_2$  alfa ( $PGF_{2\alpha}$ ), derivada da peroxidação lipídica e marcador do estresse oxidativo em humanos. Produtos da peroxidação lipídica também foram demonstrados por Ngondi e cols. (2006) em pacientes que estavam recebendo protocolos compostos por zidovudina, lamivudina e efavirenz ou nevirapina. Portanto, aumento dos níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio (ROS) ou de nitrogênio (RNS), atualmente consideradas como sinalizadores intracelulares envolvidos na regulação de várias funções celulares, tais como proliferação, fagocitose, quimiotaxia, produção de citocinas, citotoxicidade e apoptose (Remick e Villarete 1996; Nakamura e cols. 1997; Adler e cols. 1999; Allen e Tresini 2000; Marshall e cols 2000; Melley e cols. 2005; Nagy e cols. 2007; Oktyabrsky & Smirnova 2007), nos neutrófilos tratados com EFV pode ter elevado a expressão de receptores para moléculas quimiotáticas e/ou a produção de quimiocinas acarretando aumento da motilidade dos neutrófilos, expressa nestes ensaios pelo aumento do percentual de neutrófilos envolvidos na fagocitose. Evidência para esta possibilidade vem de estudos conduzidos por Filep e cols. (1998) que demonstraram que o peroxinitrito, metabólito gerado a partir da reação do ânion superóxido com o óxido nítrico, causou aumento da expressão gênica de IL-8, citocina quimiotática para neutrófilos, em granulócitos, monócitos e linfócitos estimulados com lipopolissacarídeo bacteriano (LPS). Gresham e cols. (1988) também demonstraram que estimulantes da explosão respiratória, como a anfotericina B e ésteres de forbol, aumentaram a capacidade fagocitária de polimorfonucleares para

eritrócitos de ovelha opsonizados por IgG e C3b e ainda para zimosan não opsonizados, fato revertido pelo tratamento com superóxido dismutase e catalase. O fato de o EFV ter alterado a capacidade fagocitária de neutrófilos, mas não a de monócitos (Figs. 20 e 26) pode estar associado aos diferentes perfis antioxidantes destas células, pois neutrófilos expressam altos níveis de catalase e baixos níveis de glutathione e enzimas relacionadas enquanto em monócitos ocorre o oposto (Pietarinen-Runtti e cols. 2000; Kinnula e cols. 2002). Embora não tenha sido possível demonstrar que este medicamento eleve a produção de ânion superóxido, pois não observamos alteração estatisticamente significativa do percentual de redução do NBT basal e estimulado (Fig.32) dos fagócitos tratados com EFV, é possível que um discreto aumento da produção de ROS induzido por este fármaco, no entanto, tenha sido suficiente para alterar a motilidade dos neutrófilos ou que este medicamento possa induzir a produção de outras moléculas altamente reativas que não foram mensuradas nestes ensaios, como o peróxido de hidrogênio ou óxido nítrico, e estas moléculas tenham sido responsáveis pelas alterações observadas. Nossas observações da normalização da produção do ânion superóxido estimulada pelo EFV (Fig. 34) quando os fagócitos foram expostos ao AZT (Fig. 30) e ao 3TC (Fig. 31) sugere que o EFV de fato seja uma droga pró-oxidante.

A exposição aos análogos de nucleosídeos AZT e 3TC não alterou a capacidade fagocitária dos neutrófilos pelos receptores para padrões moleculares de patógenos (Figs. 5 e 6) ou para opsoninas (Figs.10 e 11). Nossos resultados para a fagocitose efetuada por neutrófilos pelos receptores para opsoninas foi semelhante ao obtido por Roilides e cols. (1990), já que

demonstraram que o AZT em concentrações que variaram de 0,1 a 25  $\mu\text{M}$  (de 0,027 a 6,75  $\mu\text{g/ml}$ ), não alterou a capacidade fagocitária de neutrófilos para *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* opsonizados. Já a influência do AZT sobre a fagocitose por meio dos receptores para padrões moleculares de patógenos e a do 3TC sobre a capacidade fagocitária dos neutrófilos ainda não haviam sido investigadas. Nossos resultados mostraram que nas concentrações utilizadas neste experimento, que são aquelas alcançadas pelo tratamento regular de pacientes, estes fármacos não alteraram a função dos neutrófilos e sugerem que, possivelmente, não haverá prejuízo da função fagocitária dos neutrófilos nos pacientes tratados com estes medicamentos.

Os análogos de nucleosídeos têm sido associados a um prejuízo da função mitocondrial (Brinkman e cols. 1998; Lewis e cols. 2001; Day e cols. 2003; Lund e Wallace 2004; Villarroya e cols. 2005) que acarreta déficit de ATP e produção de radicais de oxigênio (Lewis e cols. 2001; Yamaguchi e cols., 2002; Szewczyk e Wojtczak, 2002). Portanto, a ausência de efeitos dos análogos de nucleosídeos testados sobre a capacidade fagocitária dos neutrófilos poderia ser explicada pelo fato de os neutrófilos apresentarem pequena quantidade de mitocôndrias, de sintetizarem pouco ATP e de utilizarem principalmente a via glicolítica para obtenção de energia (Maianski e cols. 2004).

Embora o AZT e o 3TC isoladamente não tenham influenciado a capacidade fagocitária dos neutrófilos pelos receptores para padrões moleculares de patógenos ou para opsoninas, observamos que quando associamos estas duas drogas ao EFV (Figs. 7 e 13), houve eliminação do efeito estimulador do EFV sobre a capacidade fagocitária dos neutrófilos. Este

resultado sugere que os análogos de nucleosídeos possam equilibrar a capacidade fagocitária dos neutrófilos expostos ao EFV, contrapondo-se à estimulação pela exposição ao EFV.

O tratamento com LPV/RTV por 60 minutos (Fig. 4) ocasionou depressão da capacidade fagocitária dos neutrófilos pelos receptores para padrões moleculares de patógenos em função de um decréscimo do percentual de neutrófilos envolvidos na fagocitose. Observou-se também que estas drogas apresentaram uma tendência a diminuir a quantidade de leveduras fagocitadas. Estes resultados sugerem que a associação LPV/RTV possa diminuir a expressão ou impedir a transdução de sinais a partir dos receptores para padrões moleculares de patógenos e quimiotáticos. De fato, decréscimo da quimiotaxia dos neutrófilos tratados com LPV e RTV estimulada por peptídeos formilados (fMLP) foi descrita por Hadad e cols. (2007).

Embora o tratamento com LPV/RTV tenha alterado a capacidade fagocitária pelos receptores para padrões moleculares de patógenos, não alterou a capacidade fagocitária dos neutrófilos pelos receptores para opsoninas. Nossos resultados foram semelhantes aos obtidos por Hadad e cols. (2007), que demonstraram que a fagocitose efetuada por neutrófilos de zimosan opsonizado estava preservada quando concentrações do LPV e do RTV similares às do nosso experimento foram utilizadas. No entanto, quando Hadad e cols. (2007) testaram a fagocitose de zimosan opsonizado utilizando concentrações mais elevadas de LPV e RTV (de 20 a 100 µg/ml), observaram que estes inibidores da protease podem deprimir a capacidade fagocitária dos neutrófilos, fato que foi atribuído à inibição da enzima  $\mu$ -calpaína, que é uma cisteína protease envolvida no controle da quimiotaxia (Franco e Huttenlocher

2005; Baud 2003; Lokuta e cols. 2003) e da fagocitose efetuada por neutrófilos de partículas opsonizadas por C3bi (Dewitt e Hallet 2002). Como em nossas observações a fagocitose efetuada por neutrófilos pelos receptores para opsoninas estava preservada (Fig. 12), é improvável que a inibição desta enzima durante o tratamento com LPV/RTV tenha sido responsável pelas alterações observadas na capacidade fagocitária dos neutrófilos pelos receptores para padrões moleculares de patógenos. Observamos, no entanto, que o LPV/RTV deprimiu a produção basal e estimulada (Fig.33) de radicais de oxigênio por neutrófilos e monócitos, resultado semelhante ao obtido Hadad e cols. (2007) ao utilizarem baixas concentrações de LPV/RTV, sugerindo a possibilidade de que a depressão da capacidade fagocitária dos neutrófilos pelos receptores para padrões moleculares de patógenos evidenciada em nosso trabalho tenha sido ocasionada pelo decréscimo de ROS induzido pelo LPV/RTV.

A associação AZT, 3TC e LPV/RTV (Fig. 4) diminuiu a fagocitose efetuada pelos neutrófilos por meio dos receptores para padrões moleculares de patógenos somente quando os neutrófilos foram expostos aos medicamentos por 60 minutos. Não foram observados efeitos cumulativos com a adição do AZT e do 3TC, pois não houve diferença entre os neutrófilos tratados apenas com LPV/RTV (Fig. 8) e aqueles tratados com AZT, 3TC e LPV/RTV (Fig. 8) indicando, portanto que os efeitos sobre a fagocitose evidenciados nestes ensaios foram causados exclusivamente pelo LPV/RTV. Este resultado indica também que estes análogos foram incapazes de antagonizar a ação do LPV/RTV sobre os neutrófilos, o que provavelmente associou-se a incapacidade do AZT e do 3TC de estimularem a produção de ROS

mitocondrial de neutrófilos em virtude da baixa quantidade de mitocôndrias que estas células apresentam.

Com relação aos monócitos, observamos que o AZT (Fig. 18) tendeu a aumentar a capacidade fagocitária destas células pelos receptores para padrões moleculares de patógenos por aumentar o percentual de monócitos envolvidos na fagocitose, sugerindo que este medicamento altera a capacidade quimiotática destes fagócitos. Esta tendência possivelmente associou-se a uma modificação do equilíbrio redox dos monócitos ocasionada pelo AZT, pois esta droga altera a produção de ROS mitocondrial (Lewis e cols. 2001; Yamaguchi e cols., 2002; Szewczyk e Wojtczak, 2002).

A hipótese acima é apoiada por relatos que têm demonstrado que os radicais de oxigênio participam da regulação da fagocitose e da quimiotaxia de monócitos e macrófagos, fato observado por Saccani e cols. (2000), que demonstraram que monócitos do sangue periférico de indivíduos saudáveis tratados com o antioxidante ditiocarbamato pirrolidina apresentaram diminuição da quimiotaxia estimulada por MCP-1, MIP-1 $\beta$  e SDF-1 e da expressão de seus respectivos receptores CCR2, CCR5 e CXCR4. Demonstraram também que o tratamento de monócitos com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e O<sub>2</sub><sup>-</sup>, gerado pelo sistema xantina/xantina oxidase, aumentou a expressão de RNA<sub>m</sub> para CCR2, CCR5 e CXCR4, da secreção de MCP-1 e MIP-1 $\beta$  e da quimiotaxia estimulada por MIP-1 $\beta$ . Outros pesquisadores como Emre e cols. (2007), verificaram que macrófagos peritoneais derivados de camundongos *knockout* para proteína desacopladora 2 (UCP-2), responsável pela diminuição da produção de ROS mitocondrial (Ricquer e Bouillaud 2000; Echtay e cols. 2002; Kim e cols. 2007), apresentaram um aumento da migração transendotelial e da liberação da

quimiocina MCP-1 e ainda que macrófagos desta linhagem de camundongos produziram mais óxido nítrico (NO) e IL-1 $\beta$  e infiltraram-se acentuadamente em ilhotas de Langerhans lesadas com estreptozotocina (STZ). Já Pomaki e cols. (2005) mostraram que macrófagos peritoneais tratados com baixas concentrações dos antioxidantes glutatona, n-acetilcisteína e tioprolina aumentaram a capacidade fagocitária. De fato, observamos que o AZT (Fig. 30) e o 3TC (Fig. 31) alteraram o potencial oxirredutor dos fagócitos, pois estes fármacos deprimiram a produção de ânion superóxido dos neutrófilos e monócitos estimulados com *Saccharomyces cerevisiae*, o que provavelmente associou-se à tendência do AZT em aumentar o percentual de monócitos envolvidos na fagocitose pelos receptores para padrões moleculares de patógenos. É possível que o AZT tenha alterado a produção de outros reativos de oxigênio não mensurados, pois tendeu a aumentar a motilidade dos monócitos enquanto que o 3TC, um análogo de nucleosídeo e inibidor da transcriptase reversa como o AZT, não alterou a motilidade destas células.

O fato de o AZT e de o 3TC terem exercido influência sobre a produção de ânion superóxido apenas após ativação celular, possivelmente deveu-se ao aumento da fosforilação destes fármacos nas células ativadas, fato que tem sido documentado por alguns pesquisadores, como Sales e cols. (2001), que relataram que células mononucleares do sangue periférico estimuladas pela fitohemaglutinina e tratadas com 0,1  $\mu$ M (0,027  $\mu$ g/ml) de AZT apresentaram um aumento nos níveis de fosforilação de AZT e diminuição da resposta proliferativa demonstrada pelo decréscimo da redução do MTT. Aumento dos níveis de fosforilação dos análogos de nucleosídeos também tem sido documentado em indivíduos VIH positivos com concentrações séricas elevadas

de IFN, FTN, receptor 2 solúvel para FTN e aumento dos marcadores de ativação linfocitária CD38 e HLA-DR (Anderson e cols. 2004).

Desconhece-se a razão pela qual o AZT e o 3TC determinaram o decréscimo da produção de ânion superóxido. Nossos achados contrastam com alguns dados da literatura que implicam os análogos de nucleosídeos como indutores da produção de ROS em vários tecidos. Lagathu e cols. (2007) demonstraram que monócitos THP-1 tratados com AZT apresentaram produção aumentada de superóxido, IL-1 $\beta$  e FNT- $\alpha$ . Szewczyk e Wojtczak (2002) relataram que miócitos cardíacos e hepatócitos expostos ao AZT geraram mais ânions superóxido e peroxinitrito, assim como produtos da oxidação lipídica, protéica e dos ácidos nucléicos mitocondriais. Aumento da produção de espécies reativas de oxigênio em células tratadas com estes medicamentos também já foi descrito para macrófagos peritoneais (Komarov e cols. 2004), músculo esquelético (Asunción e cols. 1998), aorta de camundongos e células endoteliais aórticas bovinas (Sutliff e cols. 2002) e células endoteliais de veia umbilical humana (Jiang e cols. 2007). Os ensaios efetuados por estes pesquisadores, no entanto utilizaram um tempo de exposição aos análogos de nucleosídeos mais prolongado do que os 45 minutos empregados neste trabalho. É possível que os resultados que obtivemos representem as fases iniciais da interação dos análogos de nucleosídeos com os fagócitos.

Embora o AZT tenha alterado a capacidade fagocitária dos monócitos pelos receptores para padrões moleculares de patógenos, não alterou a fagocitose pelos receptores para opsoninas. Dado semelhante foi obtido por Azzam e cols. (2006), que demonstraram que o AZT e o 3TC não alteraram a

capacidade fagocitária de macrófagos derivados de monócitos para eritrócitos de ovelha opsonizados. Este resultado sugere que alterações leves no potencial oxirredutor dos monócitos, como evidenciado pelo teste do NBT estimulado quando os fagócitos foram tratados com AZT e 3TC, não interfira com a expressão ou transdução de sinais dos receptores quimiotáticos e fagocitários para fragmentos do complemento.

As drogas LPV/RTV (Fig. 16) determinaram aumento da capacidade fagocitária dos monócitos por meio dos receptores para padrões moleculares de patógenos em células expostas por 30 minutos em função do aumento da média de leveduras ingeridas/aderidas por monócito e do percentual de monócitos envolvidos na fagocitose. No entanto, aos 60 minutos houve uma queda da capacidade fagocitária mediada por estes receptores em detrimento de uma diminuição do percentual de monócitos envolvidos na fagocitose. Desconhece-se a razão para esses resultados, entretanto podem estar associados às propriedades antioxidantes destas drogas evidenciadas nos ensaios do NBT basal e estimulado. Como não se conhecem os níveis de ROS ou RNS necessários a modulação da fagocitose ou quimiotaxia de monócitos, é possível que um leve decréscimo da concentração destas moléculas possa acentuar a capacidade fagocitária de monócitos enquanto que depleção acentuada acarrete um prejuízo à fagocitose efetuada por estas células.

Os inibidores da protease LPV/RTV (Fig. 23) somente deprimiram a fagocitose de monócitos para opsoninas quando as células foram incubadas com estas drogas por 60 minutos. Isto ocorreu pela diminuição da média de leveduras ingeridas/aderidas por monócito sugerindo que estes medicamentos possam diminuir a expressão dos receptores para opsoninas ou inibir as vias

de ativação da fagocitose a partir destes receptores em monócitos. Não se conhece a razão pela qual este medicamento ocasionou este resultado, entretanto pode estar associado ao decréscimo da produção do ânion superóxido determinado pelo LPV/RTV. Estudos conduzidos por Ryu e cols. (2004) apóiam esta hipótese, pois mostraram que macrófagos THP-1 transfectados para expressarem quantidades excessivas de UCP-2, exibiram um decréscimo da produção de ROS e da taxa de migração transendotelial associada à diminuição da expressão de integrina CD11b/CD18, também conhecida como CR3, utilizada para fagocitose de partículas opsonizadas pelo complemento (May e Machesky 2001).

Verificamos ainda que o tratamento de monócitos com AZT, 3TC e LPV/RTV (Fig. 17) por 30 minutos aumentou a capacidade fagocitária pelos receptores para padrões moleculares de patógenos destas células, resultado que foi semelhante ao observado para monócitos expostos ao LPV/RTV isoladamente. Já aos 60 minutos, esta associação não influenciou a fagocitose efetuada por monócitos por estes receptores. A capacidade fagocitária dos monócitos pelos receptores para opsoninas tratados com este protocolo, no entanto, permaneceu normal tanto aos 30 minutos quanto aos 60 minutos de incubação. Nas duas situações, monócitos expostos ao AZT, 3TC e LPV/RTV durante 60 minutos apresentaram comportamento diferente daqueles tratados exclusivamente com LPV/RTV, sugerindo que o uso concomitante e mais prolongado dos análogos de nucleosídeos AZT e 3TC possa ter contribuído para a normalização da capacidade fagocitária dos monócitos.

Embora o tratamento dos fagócitos com os antiretrovirais zidovudina, lamivudina, efavirenz e lopinavir/ritonavir isoladamente ou em associação

tenham sido avaliados apenas *in vitro*, é possível que os resultados encontrados possam expressar os valores encontrados *in vivo*, pois as concentrações utilizadas em nossos ensaios foram semelhantes às observadas nos indivíduos em uso destes medicamentos.

Os dados aqui apresentados, no entanto, derivaram de uma única exposição aos fármacos estudados. Pela utilização continuada das drogas, é possível que as alterações da capacidade fagocitária dos neutrófilos e monócitos possam se tornar mais evidentes, fato já documentado para alguns tecidos como o muscular, pancreático, hepático, nervoso e adiposo (Brinkman e cols. 1998; Villarroya e cols. 2005). Além disso, deve ser considerado também que variações farmacocinéticas individuais (Back e cols. 2001; Marzolini e cols. 2001; Duong e cols. 2004) possam influenciar a função fagocitária de modo mais pronunciado. Fato também relevante é que os fagócitos dos indivíduos infectados pelo VIH podem estar ativados (Elbim e cols. 1994; Elbim e cols. 1999) ou deprimidos (Muñoz e cols., 1999 & Dios e cols., 2000) o que pode influenciar o tipo de resposta do sistema de fagócitos a estes medicamentos. Entretanto, não conseguiríamos avaliar a ação dos medicamentos sobre os fagócitos sem tendenciosidade utilizando células de indivíduos infectados pelo vírus, pois seria impossível determinar se as alterações observadas seriam derivadas da ação das drogas ou da própria infecção.

Considerando apenas as interações dos antiretrovirais com os monócitos e neutrófilos aqui avaliadas podemos sugerir que a associação AZT, 3TC e EFV, pelo fato de não ter alterado a fagocitose ou a produção de radicais de oxigênio pelos fagócitos, poderia ser a escolha mais adequada para o

tratamento inicial da infecção pelo VIH, enquanto que o protocolo AZT, 3TC e LPV/RTV, por sua propriedade moduladora da função fagocitária, poderia ser reservado para os casos em que haja intolerância ou resistência ao EFV. É possível também que protocolos que utilizem LPV/RTV sejam benéficos para a manutenção do tratamento dos pacientes com resistência aos múltiplos esquemas antiretrovirais, pois diminuíram a produção de ROS pelos fagócitos, isoladamente ou em associação com o AZT e 3TC, moléculas que têm sido relacionadas ao aumento da apoptose celular em pesquisas relacionadas ou não com o VIH (Israel e Gougerot 1997; Banki e cols. 1998; Matarrese e cols., 2003; Badley e cols. 2003, Melley e cols. 2005; Vlahakis e cols. 2007) e que estimulam a replicação deste vírus (Schreck e cols. 1991; Baruchel e Wainberg 1992, Aquaro e cols. 2007) contribuindo desse modo para a diminuição da taxa de replicação viral e para a manutenção da viabilidade celular nos infectados pelo VIH. A redução da produção de reativos de oxigênio vista pelo tratamento dos fagócitos com LPV/RTV poderia contribuir ainda para a diminuição das alterações neurológicas relacionadas à infecção pelo VIH, pois os radicais de oxigênio, como o ânion superóxido, o óxido nítrico e o peroxinitrito, produzidos por macrófagos perivascularres e micróglia tem sido parcialmente responsabilizados pela neurodegeneração induzida pelo VIH (Gendelman e cols. 1994; Boven e cols. 1999; González-Scarano e Martín-García 2005). Portanto, nossos dados sugerem que a associação do AZT e do 3TC com o EFV, por não interferir nas funções dos fagócitos, pode ser mais indicada nas fases iniciais do tratamento, enquanto que o LPV/RTV, por diminuir a produção de radicais de oxigênio, possa contribuir para um decréscimo da replicação

viral, da lesão neuronal e da apoptose, que é um dos fatores responsáveis pela depleção linfocitária, associadas a infecção pelo VIH.

## **CONCLUSÕES**

Os resultados obtidos com este trabalho permitiram as seguintes conclusões:

1. O EFV isoladamente estimulou a capacidade fagocitária dos neutrófilos pelos receptores para padrões moleculares de patógenos (rPMP) enquanto que as associações LPV/RTV e AZT/3TC/LPV/RTV deprimiram a capacidade fagocitária destas células mediada por estes receptores. Os demais fármacos, isoladamente (AZT, 3TC) ou em associação (AZT/3TC/EFV), não influenciaram a fagocitose efetuada por neutrófilos pelos rPMP.

2. A pré-incubação dos fagócitos por 30 minutos com LPV/RTV aumentou a fagocitose pelos monócitos pelos receptores para padrões moleculares de patógenos, entretanto quando a pré-incubação foi feita por 60 minutos ocorreu diminuição do índice fagocitário. O tratamento dos monócitos com a associação do AZT e do 3TC com o LPV/RTV por 30 minutos determinou resultados semelhantes aos observados com LPV/RTV isoladamente, ou seja, houve aumento da capacidade fagocitária dos monócitos por meio dos rPMP. Entretanto, não houve alteração da capacidade fagocitária destas células quando foram pré-incubadas por 60 minutos com estes medicamentos. Isoladamente, o análogo de nucleosídeo AZT tendeu a aumentar a capacidade fagocitária de monócitos por meio dos rPMP. Os demais tratamentos empregados (3TC, EFV e AZT/3TC/EFV) não alteraram a capacidade fagocitária destas células pelos rPMP.

3. Quando a fagocitose foi testada pelos receptores para opsoninas, verificamos que apenas o EFV isoladamente aumentou o envolvimento de neutrófilos na fagocitose. A pré-incubação com LPV/RTV por 30 minutos causou uma tendência ao aumento da capacidade fagocitária dos neutrófilos por estes receptores, embora após 60 minutos de pré-incubação nenhuma alteração tenha sido observada. A exposição dos neutrófilos ao AZT e ao 3TC isoladamente ou a associação AZT/3TC/LPV/RTV não influenciou a capacidade fagocitária dos neutrófilos pelos receptores para opsoninas.

4. Na análise da fagocitose efetuada por monócitos pelos receptores para opsoninas, apenas a pré-incubação por 60 minutos com LPV/RTV deprimiu a capacidade fagocitária. Os demais tratamentos não alteraram a capacidade fagocitária dos monócitos por meio destes receptores.

5. A produção de radicais de oxigênio foi mais abrangentemente influenciada pelos antiretrovirais estudados. O AZT e o 3TC isoladamente e as associações LPV/RTV e AZT/3TC/LPV/RTV diminuíram a produção estimulada do ânion superóxido pelos fagócitos. O percentual de redução do NBT basal também foi deprimido pela associação LPV/RTV e AZT/3TC/LPV/RTV e tendeu a ser reduzido pelo 3TC isoladamente. A exposição ao AZT e ao EFV ou a associação AZT/3TC/ EFV não influenciou a produção basal desta molécula.

6. As conclusões encontram-se resumidas na tabela a seguir:

Fármaco	Fagocitose (rPMP)			Fagocitose (Opsoninas)			NBT								
	Neutrófilos			Monócitos			Basal	Estim.							
	IF	M	%	IF	M	%			IF	M	%				
AZT	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	↓	
3TC	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	↓	↓
EFV	↑	=	↑	=	=	=	=	=	↑	=	=	=	=	=	=
LPV/RTV	=	=	=	↑	↑	↑	=	=	=	=	=	=	=	↓	↓
LPV/RTV 1H	↓	↓	↓	↓	=	↓	=	=	=	↓	↓	=	=	↓	↓
AZT/3TC/EFV	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
AZT/3TC/LPV/RTV	=	=	=	↑	↑	↑	=	=	=	=	=	=	=	↓	↓
AZT/3TC/LPV/RTV 1H	↓	↓	↓	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	↓	↓

rPMP = Receptores para padrões moleculares de patógenos; IF = Índice fagocitário; M = Média de leveduras fagocitadas por fagócito; % = Percentual de fagócitos envolvidos na fagocitose; Estim. = Estimulado

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Abbas AK, Lichtman AH. Imunidade Inata. Em: Abbas AK, Lichtman AH (Eds).  
Imunologia celular e molecular, 5ª Edição, Elsevier, Rio de Janeiro, 2005,  
p. 283-305.

Adler V, Yin Z, Tew KD, Ronai Z. Role of potential redox and reactive oxygen  
species in stress signaling. *Oncogene*, 1999, **18**: 6014-6111.

Allen LH, Aderem A. Mechanisms of phagocytosis. *Current Opinion in  
Immunology*, 1996, **8**: 36-40.

Allen RG, Tresini M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radical Biology  
& Medicine*, 2000, **28**: 463-499.

Anderson PL, Kakuda TN, Lichtenstein KA. The cellular pharmacology of  
nucleoside- and nucleotide-analogue reverse transcriptase inhibitors and its  
relationship to clinical toxicities. *Clinical Infectious Diseases*, 2004, **38**: 743-  
753.

Antonelli A, Brandi G, Casabianca A. 2,3-Dideoxycytidine cytotoxicity in human  
macrophages. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1997, **1358**: 39-45.

Aquaro S, Muscoli C, Ranazzi A, Pollicita M, Granato T, Masuelli L, Modesti A,  
Perno C, Mollace V. The contribution of peroxynitrite generation in HIV  
replication in human primary macrophages. *Retrovirology*, 2007, **4**: 76.

Asunción J G, Olmo M L, Sastre A, Pellin A, Pallardô F V. AZT treatment induces molecular and ultrastructural oxidative damage to muscle mitochondria. *Journal of Clinical Investigation*, 1998, **102**: 4-9.

Azzam R, Lal L, Goh S, Kedzierska K, Jaworowski A, Naim E, Cherry CL, Wesselingh SL, Mills J, Crowe S. Adverse effects of antiretroviral drugs on HIV-1-infected and –uninfected human monocyte-derived macrophages. *Journal of Acquired Deficiency Syndrome*, 2006, **42**: 19-27.

Back DJ, Khoo SH, Gibbons SE, Merry C. The role of therapeutic drug monitoring in treatment of HIV infection. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 2001, **51**: 301 - 308.

Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood*, 1999, **93**: 1464-1476.

Badley AD, Roumier T, Lum JJ, Kroemer G. Mitochondrion-mediated apoptosis in HIV-1 infection. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2003, **24**: 298-305.

Banki K, Hutter E, Gonchoroff NJ, Perl A. Molecular ordering in HIV-induced apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, **273**: 11944-11953.

Baruchel S, Wainberg MA. The role of oxidative stress in disease progression in individuals infected by the human immunodeficiency virus. *Journal of Leukocyte Biology*, 1992, **52**: 111-114.

Baud L, Fouqueray B, Bellocq A, Peltier J. Les calpaïnes participant au développement de la reaction inflammatoire. *Medicine Sciences*, 2003, **19**: 71-76.

Beck JM. The Immunocompromised host. *The Proceedings of the American Thoracic Society*, 2005, **2**: 423-427.

Beq S, Bugault F, Colle J, Lambotte O, Delfraissy J, Thèze J. Anti-retroviral therapy in HIV-infected patients: in vitro effects of AZT and saquinavir on the response of CD4 and CD8 lymphocytes to interleukin-7. *European Cytokine Network*, 2005, **16**: 293:299.

Biggs BA, Hewish M, Kent S, Hayes K, Crowe SM. HIV-1 infection of human macrophages impairs phagocytosis and killing of *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Immunology*, 1995, **154**: 6132-6139.

Bradshaw EL, Li X, Guerin T, Everson WV, Wilson ME, Bruce-Keller AJ, Greenberg R, Guo L, Ross AS, Smart EJ. Nucleoside reverse transcriptase inhibitors prevent HIV protease inhibitor-induced atherosclerosis by ubiquitination and degradation of protein kinase c. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 2006, **291**: 1271-1278.

Blasi E, Colombari B, Orsi CF, Pinti M, Troiano L, Cossarizza A, Esposito R, Peppoloni S, Mussini C, Neglia R. The human immunodeficiency virus (HIV) protease inhibitor indinavir directly affects the opportunistic fungal

pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Federation of European Microbiological Societies Immunology and Medical Microbiology*, 2004, **42**: 187-195.

Brinkman K, Hofstede HJM, Burger DM, Smeitink JAM, Koopmans PP. Adverse effects of reverse transcriptase inhibitors: mitochondrial toxicity as common pathway. *AIDS*, 1998, **12**: 1735-1744.

Brown GD, Gordon S. Immune recognition of fungal  $\beta$ -glucans. *Cellular Microbiology*, 2005, **7**: 471-479.

Brandi MCAC. Padronização de um método de obtenção de fagócitos do sangue periférico para avaliação funcional. Dissertação de Mestrado. Brasília (DF), 1993.

Boven LA, Gomes L, Hery C, Gray F, Verhoef J, Portegies P, Tardieu M, Nottet HSLM. Increased peroxynitrite activity in AIDS Dementia Complex: implications for the neuropathogenesis of HIV-1 infection. *The Journal of Immunology*, 1999, **162**: 4319-4327.

Campbell DE, Douglas SD. Phagocytic cells functions. I. Oxidation and chemotaxis. Em: Rose NR, Macario EC, Folds JD, Lane HC, Nakamura RM (eds). *Manual of Clinical Laboratory Immunology*, 5ª Edição, American Society for Microbiology Press, Washington, 1997, 320-328.

- Carréno S, Cabec V, Moisand A, Bordier C, Maridonneau-Parini I. Complement receptor 3 (CD11b/CD18) mediates type 1 and type II phagocytosis during nonopsonic and opsonic phagocytosis, respectively. *The Journal of Immunology*, 2002, **169**: 2003-2009.
- Chavan S, Kodoth S, Pahwa R, Pahwa S. The HIV protease inhibitor indinavir inhibits cell-cycle progression in vitro in lymphocytes of HIV-infected and uninfected individuals. *Blood*, 2001, **98**:383-389.
- Chaturvedi S, Newman SL. Modulation of the effector function of human macrophages for *Histoplasma capsulatum* by HIV-1. *Journal of Clinical Investigation*, 1997, **100**: 1465-1474.
- Clerici M, Villa ML, Trabattoni D, Shearer GM. The breakdown of the cytokine network subsequent to human immunodeficiency virus infection. *Mediators of inflammation*, 1995, **4**: 315-321.
- Conselho Nacional de Saúde. Resolução N<sup>o</sup> 196. Diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos 1996. Disponível em: [conselho.saude.gov.br/docs/Reso196.doc](http://conselho.saude.gov.br/docs/Reso196.doc). Data de acesso: 15-04-2008.
- Crowe SM, Vardaxis NJ, Kent ST, Maerz AL, Hewish MJ, McGrath MS, Mills J. HIV infection of monocyte-derived macrophages in vitro reduces

phagocytosis of *Candida albicans*. *Journal of Leukocyte Biology*, 1994, **56**: 318-327.

Day BJ, Lewis W, Copeland WC. Mitochondrial toxicity of NRTI antiviral drugs: an integrated cellular perspective. *Nature Reviews*, 2003, **3**: 812-820.

Delsite RL, Rasmussen LJ, Rasmussen AK, Kalen A, Goswami PC, Singh KK. Mitochondrial impairment is accompanied by impaired oxidative DNA repair in the nucleus. *Mutagenesis*, 2003, **18**: 497-503.

Dewitt S, Hallett MB. Cytosolic free  $Ca^{2+}$  changes and calpain activation are required for  $\beta$  integrin-accelerated phagocytosis by human neutrophils. *The Journal of Cell Biology*, 2002, **159**: 181-189.

Dios PD, Hermida AO, LLerena NR, Martin II, Varela IO, Vázquez CM. Effect of plasma human immunodeficiency virus type 1 RNA levels on neutrophil oxidative burst. *The Journal of Infectious Diseases*, 2000, **181**: 1214-1215.

Dressman J, Kincer J, Matveev S, Guo L, Greenberg RN, Guerrin T, Maede D, Li X, Zhu W, Uittenbogaard A, Wilson ME, Smart EJ. HIV protease inhibitors promote atherosclerotic lesion formation independent of dyslipidemia by increasing CD36-dependent cholesteryl ester accumulation in macrophages. *The Journal of Clinical Investigation*, 2003, **111**: 389-397.

- Duong M, Golzi A, Peytavin G, Piroth L, Froidure M, Grappin M, Buisson M, Kohli E, Chavanet P, Portier H. Usefulness of therapeutic drug monitoring of antiretrovirals in routine clinical practice. *HIV Clinical Trials*, 2004, **5**: 216-223.
- Echtay K S, Murphy M P, Smith R A J, Talbot D A, Brand M. Superoxide activates mitochondrial uncoupling protein 2 from matrix side: studies using targeted antioxidants. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, **277**: 47129-47135.
- Elbim C, Prevost MH, Hakim J, Gougerot-Pocidal MA, Bouscarat F, Franzini E, Chollet-Martin S. Polymorphonuclear neutrophils from human immunodeficiency virus-infected patients show enhanced activation, diminished fMLP-induced L-selectin shedding, and an impaired oxidative burst after cytokine priming. *Blood*, 1994, **84**: 2759-2766.
- Elbim C, Pillet S, Prevost MH, Preira A, Girard PM, Rogine N, Matusani H, Hakim J, Israel N, Gougerot-Pocidal MA. Redox and activation status of monocytes from human immunodeficiency virus-infected patients: relationship with viral load. *Journal of Virology*, 1999, **73**: 4561-4566.
- Emre Y, Hurtaud C, Nubel T, Criscuolo F, Ricquier D, Cassard-Doulicier A. Mitochondria contribute to LPS-induced MAPK activation via uncoupling protein UCP2 in macrophages. *Biochemical Journal*, 2007, **402**: 271-278.

Emre Y, Hurtaud C, Karaca M, Nubel T, Zavala F, Ricquier D. Role of uncoupling protein UCP2 in cell-mediated immunity: How macrophage-mediated insulinitis is accelerated in a model of autoimmune diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, **104**: 19085-19090.

Filep J, Beauchamp M, Baron C, Paquette Y. Peroxynitrite mediates IL-8 gene expression and production in lipopolysaccharide-stimulated human whole blood. *The Journal of Immunology*, 1998, **161**: 5656-5662.

Francke S, Orosz CG, Hsu J, Mathes LE, Haues KA. Effect of zidovudine on the primary cytotoxic T-lymphocyte response and T-cell effector function. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2000, **44**: 1900-1905.

Francke S, Orosz CG, Hsu J, Mathes LE. Immunomodulatory effect of zidovudine (ZDV) on cytotoxic T lymphocytes previously exposed to ZDV. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2002, **46**: 2865-2871.

Franco SJ, Huttenlocher A. Regulating cell migration. *Journal of Cell Sciences*, 2005, **118**: 3829-3838.

Gantner B N, Simmons RM, Canavera SJ, Akira S, Underhill DM. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *The Journal of Experimental Medicine*, 2003, **197**: 1107-1117.

Gendelman HE, Lipton SA, Tardieu M, Bukrinsky MI, Nottet HSLM. The neuropathogenesis of HIV-1 infection. *Journal of Leukocyte Biology*, 1994, **56**: 389-398.

Giaimis J, Lombard Y, Fonteneau P, Muller C D, Levy R, Makaya-Kumba M, Lazdins J, Poindron P. Both mannose and  $\beta$ -glucan receptors are involved in phagocytosis of unopsonized, heat-killed *Saccharomyces cerevisiae* by murine macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, 1993, **54**: 564-571.

Goodman AG, Hardman JG, Limbird LE. Agentes anti-retrovirais. Em: Goodman AG, Hardman JG, Limbird LE (Eds). *As bases farmacológicas da terapêutica*, 10<sup>a</sup> edição, McGraw-Hill, Rio de Janeiro, 2003, p.1011-1033.

González-Scarano F, Martín-García J. The neuropathogenesis of AIDS. *Nature Reviews*, 2005, **5**: 69-78.

Greenberg S, Grinstein S. Phagocytosis and innate immunity. *Current Opinion in Immunology*, 2002, **14**: 136-145.

Gresham HD, McGarr JA, Shackelford PG, Brown EJ. Studies on the molecular mechanisms of human Fc receptor-mediated phagocytosis. Amplification of ingestion is dependent on the generation of reactive oxygen metabolites and is deficient in polymorphonuclear leukocytes from patients with chronic granulomatous disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 1988, **82**: 1192-1201.

Groettrup M, Patrice A, Klenerman P, Giuli R, Booth BL, Cerundolo V, Bonneville M, Jotereau F, Zinkernagel RM. An inhibitor of HIV-1 protease modulates proteasome activity, antigen presentation and cell responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, **95**: 13120-13124.

Groettrup M, , Gunter Schmidtke, Holzhütter HG, Bogyo M, Kairies N, Groll M, Giuli R, Emch S. How an inhibitor of the HIV-1 modulates proteasome activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, **274**: 35734-35740.

Gruber A, Wheat JC, Kuhlen KL, Looney DJ, Wong-Staal F. Differential effects of HIV-1 protease inhibitors on dendritic cell immunophenotype and function. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, **276**: 47840-47843.

Hadad N, Levy R, Schlaeffer F, Riesenber K. Direct effect of human immunodeficiency virus protease inhibitors on neutrophil function and apoptosis via calpain inhibition. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2007, **14**: 1515-1521.

Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature Reviews*, 2000, **12**: 770-775.

Hoffman C, Mulcahy F. HIV Medicine 2007. Disponível em: [www.hivmedicine.com](http://www.hivmedicine.com). Data de acesso: 01-12-2007

Hulgan T, Morrow J, D'Aquila R, Raffanti S, Morgan M, Rebeiro P, Haas DW.

Oxidant stress is increased during treatment of human immunodeficiency virus infection. *Clinical Infectious Diseases*, 2003, **37**: 1711-1717.

Isaac Adil, Taylor Stephen, Cane Patricia, Simit Erasmus, Gibbons Sarah E,

White David J, Drake Susan M, Khoo Saye, Back David J. Lopinavir/ritonavir combined with twice-daily 400 mg indinavir: pharmacokinetics and pharmacodynamics in blood, CSF and semen. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2004, **54**: 498-502.

Israël N, Gougerot-Pocidallo Ma. Oxidative stress in human immunodeficiency

virus infection. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1997, **53**: 864-870.

Janeway C, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annual Review of*

*Immunology*, 2002, **20**: 197-216.

Jiang B, Hebert VY, Li Y, Mathis JM, Alexander JS, Dugas TR. HIV

antiretroviral drug combination induces endothelial mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species production, but not apoptosis. *The Toxicology and Applied Pharmacology*, 2007, **224**: 60-71.

United Nations and World Health Organization. Joint United Nations

Programme on HIV/AIDS (UNAIDS) and World Health Organization (WHO),

AIDS Epidemic Update, December 2007. Disponível em: [www.unaids.org](http://www.unaids.org).

Data de acesso: 02-01-2008

Jutras I, Desjardins M. Phagocytosis: At the Crossroads of Innate and Adaptative Immunity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2005, **21**: 511-527.

Kim H, Park K, Koo T B, Huh S, Lee I. The modulating effects of the overexpression of uncoupling protein 2 on the formation of reactive oxygen species in vascular cells. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 2007, **77**: 46-48.

Kinnula V L, Soini Y, Kvist-Mäkelä K, Savolainen E, Koistinen P. Antioxidants defense mechanisms in human neutrophils. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2002, **4**: 27-34.

Komarov AM, Hall JM, Weglicki, WB. Azidothymidine promotes free radical generation by activated macrophages and hydrogen peroxide-iron-mediated oxidation in a cell-free system. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004, **1688**: 257-264.

Koziel H, Eichbaum Q, Kruskal BA, Pinkston P, Rogers RA, Armstrong MYK, Richards FF, Rose RM, Ezekowitz RAB. Reduced binding and phagocytosis of *Pneumocystis carinii* by alveolar macrophages from persons infected with HIV-1 correlates with mannose receptor

downregulation. *The Journal of Clinical Investigation*, 1998, **102**: 1332-1334.

Kuritzkes DR. Neutropenia, neutrophil dysfunction, and bacterial infection in patients with human immunodeficiency virus disease: the role of granulocyte colony-stimulating factor. *Clinical Infectious Diseases*, 2000, **30**: 256-260.

Lachman PJ, Hobart MJ. Complement technology. Em: Weir D M (Ed) Handbook of Experimental Immunology, volume 1. Immunochemistry. Blackwell, Oxford, 1978, 1-5A.

Lagathu C, Eustace B, Prot M, Frantz D, Gu Y, Bastard J P, Maachi M, Azoulay S, Briggs M, Caron M, Capeau J. Some HIV antiretrovirals increase oxidative stress and alter chemokine, cytokine or adiponectin production in human adipocytes and macrophages. *Antiviral Therapy*, 2007, **12**: 489-500.

Lewis W, Copeland WC, Day BJ. Mitochondrial DNA depletion, oxidative stress and mutation: mechanisms of dysfunction from nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Laboratory Investigation*, 2001, **81**: 777-789.

Lokuta MA, Nuzzi PA, Huttenlocher A. Calpain regulates neutrophil chemotaxis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, **100**: 4006-4011.

Lund K C, Wallace K B. Direct effects of nucleoside reverse transcriptase inhibitors on rat cardiac mitochondrial bioenergetics. *Mitochondrion*, 2004, **4**: 193-202.

Maiansky N A, Geissier J, Srinivasula S M, Alnemri E S, Roos D, Kuijpers T W. Functional characterization of mitochondria in neutrophils: a role restricted to apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 2004, **11**: 143-153.

Manfredi R, Calza L, Chiodo F. First-line efavirenz versus lopinavir-ritonavir-based highly active antiretroviral therapy for naïve patients. *AIDS*, 2004, **18**: 2331-2333.

Marshall HE, Merchant K, Stamler JS. Nitrosation and oxidation in the regulation of gene expression. *Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2000, **14**: 1889-1900.

Marzolini C, Telenti A, Decosterd L, Greub G, Biollaz J, Buclin T. Efavirenz plasma levels can predict treatment failure and central nervous system side effects in HIV-1-infected patients. *AIDS*, 2001, **15**: 71-75.

Mastroianni CM, Mengoni F, Lichtner M, D'Agostino C, d'Etorre G, Forcina G, Marzi M, Russo G, Massetti A, Vullo V. Ex vivo and in vitro effect of human immunodeficiency virus protease inhibitors on neutrophil apoptosis. *The Journal of Infectious Diseases*, 2000, **182**: 1536-1539.

Matarrese P, Gambardella L, Cassone A, Vella S, Cauda R, Malorni W.

Mitochondrial membrane hyperpolarization hijacks activated T lymphocytes toward the apoptotic-prone phenotype: homeostatic mechanisms of HIV protease inhibitors. *The Journal of Immunology*, 2003, **170**: 6006-6015.

May RC, Machesky LM. Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *Journal of Cell Science*, 2001, **114**: 1061-1077.

Melley DD, Evans TW, Quinlan GJ. Redox regulation of neutrophil apoptosis and the systemic inflammatory response syndrome. *Clinical Science*, 2005, **108**: 413-424.

Ministério da Saúde, Recomendações para Terapia Anti-retroviral em Adultos e Adolescentes Infectados pelo HIV 2007/2008. Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de DST e AIDS, 2007. Disponível em: [www.aids.gov.br/data/Pages/LUMISFB7D5720PTBRIE.htm](http://www.aids.gov.br/data/Pages/LUMISFB7D5720PTBRIE.htm).  
Data de acesso: 15-04-2008

Muñoz JF, Salmen S, Berrueta LR, Carlos MP, Cova JA, Donis JH, Hernández MR, Torres JV. Effect of human immunodeficiency virus type 1 on intracellular activation and superoxide production by neutrophils. *The Journal of Infectious Diseases*, 1999, **180**: 206-210.

- Muniz-Junqueira MI, Tosta CE, Peçanha LMF, Silva-Filho VL, Cardoso MCA. Novel microtechnique for assessment of postnatal maturation of the phagocytic function of neutrophils and monocytes. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 2003, **10**: 1096-1102.
- Nagy G, Koncz A, Fernandez D, Perl A. Nitric oxide, mitochondrial hyperpolarization, and T cell activation. *Free Radical Biology & Medicine*, 2007, **42**: 1625-1631.
- Nakamura H, Nakamura K, Yodoi J. Redox regulation of cellular activation. *Annual Review of Immunology*, 1997, **15**: 351-369.
- Nathoo S, Serghides L, Kain, KC. Effect of HIV-1 antiretroviral drugs on cytoadherence and phagocytic clearance of *Plasmodium falciparum*-parasitised erythrocytes. *The Lancet*, 2003, 362:1039-1041.
- Ngondi J, Oben J, Forkah D M, Etame L H, Mbanya D. The effects of different combination therapies on oxidative stress markers in HIV infected patients in Cameroon. *AIDS Research and Therapy*, 2006, **3**: 19.
- Nydegger E U, Anner R N, Gerebtzoff A, Lambert P H, Miescher P A. Polimorphonuclear stimulation by imune complexes. Assessment by nitroblue tetrazolium dye reduction. *European Journal of Immunology*, 1973, **3**: 465-470.

Ofek I, Goldhar J, Keisari Y. Nonopsonic phagocytosis of microorganisms. *Annual Review of Microbiology*, 1995, **49**: 239-276.

Oktyabrsky O N, Smirnova G V. Redox regulation of cellular functions. *Biochemistry*, 2007, **72**: 132-145.

Paranjape RS. Immunopathogenesis of HIV infection. *Indian Journal of Medical Research*, 2005, **121**: 240-255.

Pantaleo G, Fauci AS. Immunopathogenesis of HIV infection. *Annual Review of Microbiology*, 1996, **50**: 825-854.

Pettit EJ, Fay FS. Cytosolic free calcium and cytoskeleton in the control of leukocyte chemotaxis. *Physiological Reviews*, 1998, **78**: 949-967.

Pietarinen-Runtti P, Lakari E, Raivio K O, Kinnula V L. Expression of antioxidant enzymes in human inflammatory cells. *American Journal of Physiology and Cell Physiology*, 2000, **278**: 118-125.

Pitrak DL. Apoptosis and its role in neutrophil dysfunction in AIDS. *The Oncologist*, 1997, **2**: 121-124.

Pitrak DL, Tsai HC, Mullane SH, Sutton SH, Stevens P. Accelerated neutrophil apoptosis in the acquired immunodeficiency syndrome. *The Journal of Clinical Investigation*, 1996, **98**: 2714-2719.

Polo R, Martinez S, Madrigal P, Gonzalez-Muñoz M. Factors associated with mitochondrial dysfunction in circulating peripheral blood lymphocytes from HIV-infected people. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome*, 2003, **34**: 32-36.

Pomaki M, Mota J, Fuente M, Berger J. Effects of thiolic antioxidants on in vitro mouse peritoneal macrophages functions. *Comparative Clinical Pathology*, 2005, **13**: 176-181.

Pugliese A, Vidotto V, Beltrano T, Torre D. Phagocytic activity in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 2005, **12**: 889-895.

Remick DG, Villarete L. Regulation of cytokine gene expression by reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates. *Journal of Leukocyte Biology*, 1996, **59**: 471-475.

Richman, D. HIV Chemotherapy. *Nature Reviews*, 2001, **410**: 995-1000.

Ricquier D, Bouillaud F. The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *Biochemical Journal*, 2000, **345**: 161-179.

- Rolides E, Venzon D, Pizzo PA, Rubin M. Effects of antiretroviral dideoxynucleosides on polymorphonuclear leukocyte function. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1990, **34**: 1672-1677.
- Ryu J, Hong K H, Maeng J H, Kim J, Ko J, Park Y, Lee K, Hong M, Wook S W, Kim Y H, Han K H. Overexpression of uncoupling protein 2 in THP1 monocytes inhibits  $\beta_2$  integrin-mediated firm adhesion and transendothelial migration. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2004, **24**: 864-870.
- Saccani A, Saccani S, Orlando S, Sironi M, Bernasconi S, Ghezzi P, Mantovani A, Sica A. redox regulation of chemokine receptor expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, **97**: 2761-2766.
- Sales S D, Hoggard P G, Sunderland D, Khoo S, Hart C A, Back D J. Zidovudine phosphorylation and mitochondrial toxicity *in vitro*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2001, **177**: 54-58.
- Segal AW. How neutrophils kill microbes. *Annual Reviews of Immunology*, 2005, **23**: 197-223.
- Serghides L, Nathoo S, Walmsley S, Kain K. CD36 deficiency induced by antiretroviral therapy. *AIDS*, 2001, **16**: 353-358.

Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- $\kappa$ B transcription factor and HIV-1. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 1991, **10**: 2247-2258.

Shalekoff S, Tiemessen CT, Gray CM, Martin DJ. Depressed Phagocytosis and oxidative burst in polymorphonuclear leukocytes from individuals with pulmonary tuberculosis with or without human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 1998, **5**: 41-44.

Smith PF, Robbins GK, Shafer RW, Wu H, Yu S, Hirsch MS, Merigan TC, Park J, Forrest A, Fischl MA, Morse GD. Pharmacokinetics of nelfinavir and efavirenz in antiretroviral-naïve, human immunodeficiency virus-infected subjects when administered alone or in combination with nucleoside analog reverse transcriptase inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2005, **49**: 3558-3561.

Staszewski S, Morales-Ramirez J, Tashima KT, Rachlis A, Skiest D, Stanford J, Stryker R, Johnson P, Labriola DF, Farina D, Manion DJ, Ruiz NM. Efavirenz plus zidovudine and lamivudine, efavirenz plus indinavir, and indinavir plus zidovudine and lamivudine in the treatment of HIV-1 infection in adults. *The New England Journal of Medicine*, 1999, **341**: 1865-1873.

Sutliff R L, Dikalov S, Weiss D, Parker J, Raidel S, Racine A K, Russ R, Haase C, Taylor W R, Lewis W. Nucleoside reverse transcriptase inhibitors impair endothelium-dependent relaxation by increasing superoxide. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 2002, **283**: 2363-2370.

Szewczyk A, Wojtczak L. Mitochondria as a pharmacological target. *Pharmacological Reviews*, 2002, **54**: 101-127.

Taylor PR, Martinez-Pomares L, Stacey M, Lin H, Brown GD, Gordon S. Macrophage receptors and immune recognition. *Annual Reviews of Immunology*, 2005, **23**: 901-944.

Torti C, Maggiolo F, Patroni A, Suter F, Ladisa N, Paraninfo G, Pierotti P, Orani AM, Minoli L, Arici C, Sighnolfi L, Tinelli C, Carosi G. Exploratory analysis for the evaluation of lopinavir/ritonavir-versus efavirenz-based HAART regimens in antiretroviral-naive HIV-positive patients: results from the Italian master cohort. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2005, **56**: 190-195.

Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal of Physiology*, 2003, **552.2**: 335-344.

Underhill DM. Macrophage recognition of zymosan particles. *Journal of Endotoxin Research*, 2003, **9**: 176-180.

Underhill DM. Toll-like receptors: networking for success. *European Journal of Immunology*, 2003, **33**: 1767-1775.

Underhill DM, Aderem A. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual Review of Immunology*, 1999, **17**: 593-623.

Underhill DM, Ozinsky A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annual Review of Immunology*, 2002, **20**: 825-852

Vlahakis SR, Bennett SA, Whitehead SN, Badley AD. HIV protease inhibitors modulate apoptosis signaling in vitro and in vivo. *Apoptosis*, 2007, 12: 969-977.

Villarroya F, Domingo P, Giralt M. Lipodystrophy associated with highly active anti-retroviral therapy for HIV infection: the adipocyte as a target of anti-retroviral-induced mitochondrial toxicity. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2005, **26**: 88-92.

Wang Laurene H, Chittick Gregory E, McDowell James A. Single-dose pharmacokinetics and safety of abacavir (1592U89), zidovudine, and lamivudine administered alone and in combination in adults with human immunodeficiency virus infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1999, **43**: 1708-1715.

Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Mecarelli-Halbwachs L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Laboratory Investigation*, 2000, **80**: 617-640.

World Health Organization. World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects 2001. Disponível em: [whqlibdoc.who.int/bulletin/2001/issue4/79\(4\)declaration.pdf](http://whqlibdoc.who.int/bulletin/2001/issue4/79(4)declaration.pdf). Data de acesso: 15-04-2008.

Yamaguchi T, Katoh I, Kurata S. Azidothymidina causes functional and structural destruction of mitochondria, glutathione deficiency and HIV promoter sensitization. *European Journal of Biochemistry*, 2002, **269**: 2782-2788.

# **ANEXO I**

**(Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa)**



Universidade de Brasília  
Faculdade de Medicina  
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos

Campus Universitário, Asa Norte – CEP 70910-9000 – Brasília, DF - Tel.: (061) 3307-2520 / 3273-4069

### ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

**Registro de projeto:** CEP-FM 006/2007

**Título:** “Avaliação *in vitro* da influência dos anti-retrovirais zidovudina, lamiduvina, efavirenz e lopinavir/ritonavir isolados ou em combinações com rifampicina, isoniazida, pirazinamida e aciclovir sobre a função fagocitária e capacidade linfoproliferativa em indivíduos normais”

**Pesquisador responsável:** Maria Imaculada M. B. Junqueira

**Documentos analisados:** Folha de rosto, carta de encaminhamento, declaração de Responsabilidade, protocolo de pesquisa, termo de consentimento livre e esclarecido, cronograma, bibliografia pertinente e currículo(s) de pesquisador(es)

**Data de entrada:** 07/02/2007

Proposição do(a) relator(a)

(  ) Aprovação

(  ) Não aprovação

**Data da primeira análise pelo CEP-FM/UnB:** 28/02/2007

**Data do parecer final do projeto pelo CEP-FM/UnB:** 28/11/2007

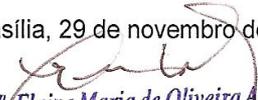
### PARECER

Com base na Resolução CNS/MS Nº 196/96, que regulamenta a matéria, a Coordenação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília decidiu **APROVAR** em sua 10ª reunião, realizada no dia 28 de novembro de 2007, conforme parecer do(a) relator(a), o projeto de pesquisa acima especificado, quanto aos seus aspectos éticos.

1 – Modificações no protocolo devem ser submetidas ao CEP, assim como a notificação imediata de eventos adversos graves;

2 – O(s) pesquisador(es) deve(m) apresentar relatórios periódicos do andamento da pesquisa ao CEP-FM.

Brasília, 29 de novembro de 2007.

  
Prof.<sup>a</sup> Elaine Maria de Oliveira Alves  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa  
Faculdade de Medicina-UnB

# **ANEXO II**

**(Termo de Consentimento Livre e Esclarecido)**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA / FACULDADE DE MEDICINA  
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA  
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL  
LABORATÓRIO DE IMUNOLOGIA CELULAR

PROJETO DE PESQUISA

Avaliação *in vitro* da influência dos anti-retrovirais zidovudina, lamiduvina, efavirenz e lopinavir/ritonavir isolados ou em combinações com rifampicina, isoniazida, pirazinamida e aciclovir sobre a função fagocitária e capacidade linfoproliferativa em indivíduos normais

RESPONSÁVEIS

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Imaculada Muniz Barboza Junqueira, Érica Alessandra Rocha Alves

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa que usa células do sangue para estudar como elas estão reagindo para a defesa do organismo na presença de remédios chamados zidovudina, lamivudina, efavirenz, lopinavir/ritonavir, rifampicina, isoniazida, pirazinamida e aciclovir que são normalmente usados para o tratamento da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana e das coinfeções associadas a ela.

As células do seu sangue serão estudadas apenas em um tubo e você não tomará nenhum medicamento.

Serão retirados 20 ml de sangue de uma veia de seu braço, utilizando material estéril e descartável, para obtenção das células que serão estudadas.

Pode ser necessária a realização de uma nova coleta do seu sangue, caso a quantidade de células obtidas não seja suficiente. Se for necessário você será convidado a participar novamente e assinará o termo de compromisso de novo, se você concordar.

Você pode retirar seu consentimento em qualquer momento durante a pesquisa, sem que isto lhe acarrete qualquer prejuízo ou punição.

Contato com os pesquisadores pelos telefones 3307-2273 ou 9816-0190 com a Dr<sup>a</sup> Maria Imaculada Muniz, ou 9226-2664 ou e-mail [ericaveterinaria@pop.com.br](mailto:ericaveterinaria@pop.com.br) com a Mestranda Érica Alves.

O seu nome não será divulgado.

Posteriormente, se você desejar, poderá ser informado (a) sobre o resultado do exame que foi feito no seu sangue.

Brasília,.....de.....de.....

Nome

assinatura

.....

.....

Pesquisador

.....

Testemunha

Com cópia para o voluntário

# **ANEXO III**

**(Soluções e reagentes)**

### **Solução de Hanks para estoque**

Hanks (Sigma)	9,8 g
Água bidestilada	100 ml

Diluir e filtrar em millipore, estocar em frascos estéreis e armazenar a 4°C

### **Solução de Hanks para uso pH 7,2**

1 parte da solução de Hanks estoque

9 partes de água destilada

Homogeneizar a solução e ajustar o pH com Tris alcalino 15mM

### **Tris Alcalino 15mM**

Tris (Merck)	0,18 g
Água destilada	100 ml

### **Safranina 0,05%**

Safranina (Vetec)	1,4 g
Glicerol (Reagen)	40 ml
Água destilada	100 ml

Dissolver a safranina no glicerol e a seguir na água destilada

### **NBT 0,005%**

NBT (Sigma)	0,025 mg
Hanks Tris	0,5 ml

### **Giemsa 10%**

Giemsa (Dinâmica)	2 ml
Tampão para corante	18 ml

### **Tampão para corante**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Carlo Herba)	6,63 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Vetec)	3,20 g
Água destilada	1000 ml

**Salina Tamponada Fosfatada (STF) pH 7,2 0,15M**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Carlo Herba)	2,45 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Vetec)	8,15 g
NaCl (Merck)	4,50 g
Água destilada	1000 ml
Acertar o pH com NaOH 1N	

**Solução de NaOH 1N**

NaOH (Merck)	4,0 g
Água destilada	100 ml

**Solução estoque de lamivudina**

Lamivudina (Lamivudina®, Biomanguinhos, lote 07010019)	150 mg
Salina tamponada com fosfato	10 ml

**Solução intermediária de lamivudina**

Solução estoque de lamivudina	20 µl
Salina tamponada com fosfato	2980 µl

**Solução intermediária de zidovudina**

Zidovudina (Zidovir®, Cristália, lote 07010293)	20 µl
Salina tamponada com fosfato	2980 µl

**Solução intermediária de efavirenz**

Efavirenz (Stocrin®, Merck Sharp & Dohme, lote LAW014)	20 µl
Salina tamponada com fosfato	2980 µl

**Solução intermediária de lopinavir/ritonavir**

Lopinavir/ritonavir (Kaletra®, Abbott, lote 49279AW23)	20 µl
Salina tamponada com fosfato	2980 µl

### **Solução de lamivudina para pré-incubação**

Solução intermediária de lamivudina	22,5 µl
Soro fetal bovino ou plasma	150 µl
Hanks para uso	1327,5 µl

### **Solução de zidovudina para pré-incubação**

Solução intermediária de zidovudina	40 µl
Soro fetal bovino ou plasma	150 µl
Hanks para uso	1310 µl

### **Solução de efavirenz para pré-incubação**

Solução intermediária de efavirenz	28 µl
Soro fetal bovino ou plasma	150 µl
Hanks para uso	1322 µl

### **Solução de lopinavir/ritonavir para pré-incubação**

Solução intermediária de lopinavir/ritonavir	32,2 µl
Soro fetal bovino ou plasma	150 µl
Hanks para uso	1317,8 µl

### **Solução de zidovudina, lamivudina e efavirenz para pré-incubação**

Solução intermediária de zidovudina	40 µl
Solução intermediária de lamivudina	22,5 µl
Solução intermediária de efavirenz	28 µl
Soro fetal bovino ou plasma	150 µl
Hanks para uso	1259,5 µl

### **Solução de zidovudina, lamivudina e lopinavir/ritonavir para pré-incubação**

Solução intermediária de zidovudina	40 µl
Solução intermediária de lamivudina	22,5 µl
Solução intermediária de lopinavir/ritonavir	32,2 µl
Soro fetal bovino ou plasma	150 µl
Hanks para uso	1255,3 µl

### **Solução de lamivudina para o ensaio de fagocitose e NBT estimulado**

Solução intermediária de lamivudina	22,5 µl
Soro fetal bovino ou plasma	150 µl
Levedura*	Variável
Hanks para uso*	Variável

\* Ajustados diariamente de acordo com a contagem de leveduras de modo que o volume final de 1500 µl contivesse  $2,5 \times 10^5$  leveduras a cada 20 µl

### **Solução de zidovudina para o ensaio de fagocitose e NBT estimulado**

Solução intermediária de lamivudina	40 µl
Soro fetal bovino ou plasma	150 µl
Levedura*	Variável
Hanks para uso*	Variável

\* Ajustados diariamente de acordo com a contagem de leveduras de modo que o volume final de 1500 µl contivesse  $2,5 \times 10^5$  leveduras a cada 20 µl

### **Solução de efavirenz para o ensaio de fagocitose e NBT estimulado**

Solução intermediária de lamivudina	28 µl
Soro fetal bovino ou plasma	150 µl
Levedura*	Variável
Hanks para uso*	Variável

\* Ajustados diariamente de acordo com a contagem de leveduras de modo que o volume final de 1500 µl contivesse  $2,5 \times 10^5$  leveduras a cada 20 µl

**Solução de lopinavir/ritonavir para o ensaio de fagocitose e NBT estimulado**

Solução intermediária de lamivudina	32,2 µl
Soro fetal bovino ou plasma	150 µl
Levedura*	Variável
Hanks para uso*	Variável

\* Ajustados diariamente de acordo com a contagem de leveduras de modo que o volume final de 1500 µl contivesse  $2,5 \times 10^5$  leveduras a cada 20 µl

**Solução de zidovudina, lamivudina e efavirenz para o ensaio de fagocitose e NBT estimulado**

Solução intermediária de zidovudina	40 µl
Solução intermediária de lamivudina	22,5 µl
Solução intermediária de efavirenz	28 µl
Soro fetal bovino ou plasma	150 µl
Levedura*	Variável
Hanks para uso*	Variável

\* Ajustados diariamente de acordo com a contagem de leveduras de modo que o volume final de 1500 µl contivesse  $2,5 \times 10^5$  leveduras a cada 20 µl

**Solução de zidovudina, lamivudina e lopinavir/ritonavir para o ensaio de fagocitose e NBT estimulado**

Solução intermediária de zidovudina	40 µl
Solução intermediária de lamivudina	22,5 µl
Solução intermediária de lopinavir/ritonavir	32,2 µl
Soro fetal bovino ou plasma	150 µl
Levedura*	Variável
Hanks para uso*	Variável

\* Ajustados diariamente de acordo com a contagem de leveduras de modo que o volume final de 1500 µl contivesse  $2,5 \times 10^5$  leveduras a cada 20 µl

# **ANEXO IV**

**(Tabelas das análises estatísticas)**

## TABELA 1

Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos de indivíduos normais com zidovudina sobre a capacidade fagocitária para  $2,5 \times 10^5$  *Saccharomyces cerevisiae* não sensibilizadas por escavação.

<b>Índice fagocitário</b>				
Grupos	n	mediana	quartis	extremos
Controle	20	1,0	0,25 - 5,25	0,0 - 15,0
Zidovudina	20	2,25	1,0 - 6,26	0,0 - 20,0

p=0,302, teste de Wilcoxon

<b>Média de levedura aderidas/ingeridas por neutrófilo</b>				
Grupos	n	mediana	quartis	extremos
Controle	20	1,0	0,5 - 1,8	0,0 - 2,0
Zidovudina	20	1,37	1,0 - 2,0	0,0 - 3,0

p=0,344, teste de Wilcoxon

<b>Percentual de neutrófilos envolvidos na fagocitose</b>				
Grupos	n	mediana	quartis	extremos
Controle	19	1,0	0,0 - 3,0	0,0 - 6,0
Zidovudina	20	1,5	0,5 - 4,5	0,0 - 10,0

p=0,115, teste de Wilcoxon

## TABELA 2

Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos de indivíduos normais com lamivudina sobre a capacidade fagocitária para  $2,5 \times 10^5$  *Saccharomyces cerevisiae* não sensibilizadas por escavação.

<b>Índice fagocitário</b>				
Grupos	n	mediana	quartis	extremos
Controle	20	1,0	0,25 - 5,25	0,0 - 15,0
Lamivudina	19	2,0	0,0 - 5,49	0,0 - 12,3

p=0,761, teste de Wilcoxon

<b>Média de levedura aderidas/ingeridas por neutrófilo</b>				
Grupos	n	mediana	quartis	extremos
Controle	20	1,0	0,5 - 1,8	0,0 - 2,0
Lamivudina	20	1,24	0,5 - 1,71	0,0 - 2,5

p=1,000, teste de Wilcoxon

<b>Percentual de neutrófilos envolvidos na fagocitose</b>				
Grupos	n	mediana	quartis	extremos
Controle	19	1,0	0,0 - 3,0	0,0 - 6,0
Zidovudina	19	1,0	0,0 - 4,5	0,0 - 6,5

p=0,375, teste de Wilcoxon

### TABELA 3

Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos de indivíduos normais com efavirenz sobre a capacidade fagocitária para  $2,5 \times 10^5$  *Saccharomyces cerevisiae* não sensibilizadas por escavação.

<b>Índice fagocitário</b>				
Grupos	n	mediana	quartis	extremos
Controle	20	1,0	0,25 - 5,25	0,0 - 15,0
Efavirenz	20	2,0	1,25 - 10,01	0,0 - 17,52

p=0,028, teste de Wilcoxon

<b>Média de levedura aderidas/ingeridas por neutrófilo</b>				
Grupos	n	mediana	quartis	extremos
Controle	20	1,0	0,5 - 1,8	0,0 - 2,0
Efavirenz	20	1,33	1,0 - 1,51	0,0 - 2,19

p=0,934, teste de Wilcoxon

<b>Percentual de neutrófilos envolvidos na fagocitose</b>				
Grupos	n	mediana	quartis	extremos
Controle	19	1,0	0,0 - 3,0	0,0 - 6,0
Efavirenz	20	1,75	1,0 - 6,25	0,0 - 10,50

p=0,004, teste de Wilcoxon

**TABELA 4**

Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos de indivíduos normais com lopinavir/ritonavir sobre a capacidade fagocitária para  $2,5 \times 10^5$  *Saccharomyces cerevisiae* não sensibilizadas por escavação.

<b>Índice fagocitário</b>				
Grupos	n	Mediana	quartis	extremos
Controle	20	1,0	0,25 - 5,25	0,0 - 15,0
Lopinavir/ritonavir 30 min	19	1,5	0,0 - 3,45	0,0 - 9,02
Lopinavir/ritonavir 60 min	19	0,0	0,0 - 1,99	0,0 - 7,7

30 min p=0,294, teste de Wilcoxon; 60 min p=0,024, teste de Wilcoxon

<b>Média de levedura aderidas/ingeridas por neutrófilo</b>				
Grupos	n	Mediana	quartis	extremos
Controle	20	1,0	0,5 - 1,8	0,0 - 2,0
Lopinavir/ritonavir 30 min	20	1,0	0,0 - 1,53	0,0 - 2,3
Lopinavir/ritonavir 60 min	19	0,5	0,0 - 1,16	0,0 - 2,5

30 min p=0,334, teste de Wilcoxon; 60 min p=0,090, teste de Wilcoxon

<b>Percentual de neutrófilos envolvidos na fagocitose</b>				
Grupos	n	Mediana	quartis	extremos
Controle	19	1,0	0,0 - 3,0	0,0 - 6,0
Lopinavir/ritonavir 30 min	19	1,5	0,0 - 2,5	0,0 - 5,5
Lopinavir/ritonavir 60 min	18	0,0	0,0 - 1,0	0,0 - 2,5

30 min p=0,501, teste de Wilcoxon; 60 min p=0,047, teste de Wilcoxon

## TABELA 5

Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos de indivíduos normais com zidovudina, lamivudina e efavirenz sobre a capacidade fagocitária para  $2,5 \times 10^5$  *Saccharomyces cerevisiae* não sensibilizadas por escavação.

<b>Índice fagocitário</b>				
Grupos	n	mediana	quartis	extremos
Controle	20	1,0	0,25 - 5,25	0,0 - 15,0
Zidovudina/lamivudina/efavirenz	20	1,5	0,5 - 4,2	0,0 - 16,49

p=0,669, teste de Wilcoxon

<b>Média de leveduras ingeridas/aderidas por neutrófilo</b>				
Grupos	n	mediana	quartis	extremos
Controle	20	1,0	0,5 - 1,8	0,0 - 2,0
Zidovudina/lamivudina/efavirenz	19	1,10	1,0 - 1,5	0,0 - 1,75

p=0,807, teste de Wilcoxon

<b>Percentual de neutrófilos envolvidos na fagocitose</b>				
Grupos	n	mediana	quartis	extremos
Controle	19	1,0	0,0 - 3,0	0,0 - 6,0
Zidovunina/lamivudina/efavirenz	20	1,0	0,5 - 2,75	0,0 - 10,50

p=0,951, teste de Wilcoxon

**TABELA 6**

Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos de indivíduos normais com zidovudina, lamivudina e lopinavir/ritonavir sobre a capacidade fagocitária para  $2,5 \times 10^5$  *Saccharomyces cerevisiae* não sensibilizadas por escavação.

<b>Índice fagocitário</b>				
Grupos	n	mediana	quartis	extremos
Controle	20	1,0	0,25 - 5,25	0,0 - 15,0
Zidovudina/lamivudina/lopinavir/ ritonavir 30 min	19	0,5	0,0 - 1,5	0,0 - 4,0
Zidovudina/lamivudina/lopinavir/ ritonavir 60 min	19	0,5	0,0 - 1,0	0,0 - 4,5

30 min p=0,103, teste de Wilcoxon; 60 min p=0,008, teste de Wilcoxon

<b>Média de leveduras ingeridas/aderidas por neutrófilo</b>				
Grupos	n	mediana	quartis	extremos
Controle	20	1,0	0,5 - 1,8	0,0 - 2,0
Zidovudina/lamivudina/lopinavir/ ritonavir 30 min	18	1,0	0,0 - 1,16	0,0 - 1,0
Zidovudina/lamivudina/lopinavir/ ritonavir 60 min	19	1,0	0,0 - 2,0	0,0 - 2,0

30 min p=0,187, teste de Wilcoxon; 60 min p= 0,032, teste de Wilcoxon

<b>Percentual de neutrófilos envolvidos na fagocitose</b>				
Grupos	n	mediana	quartis	extremos
Controle	19	1,0	0,0 - 3,0	0,0 - 6,0
Zidovudina/lamivudina/lopinavir/ ritonavir 30 min	19	0,5	0,0 - 1,5	0,0 - 1,0
Zidovudina/lamivudina/lopinavir/ ritonavir 60 min	19	0,5	0,0 - 2,5	0,0 - 2,5

30 min p=0,147, teste de Wilcoxon; 60 min p=0,032, teste de Wilcoxon

## TABELA 7

Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos de indivíduos normais com zidovudina sobre a capacidade fagocitária para  $2,5 \times 10^5$  *Saccharomyces cerevisiae* sensibilizadas por escavação.

<b>Índice fagocitário</b>				
Grupos	n	mediana	quartis	extremos
Controle	20	245,3	167,7 - 245,3	119,3 - 573,2
Zidovudina	20	235,5	185,6 - 349,9	102,8 - 455,5

p=0,977, teste de Wilcoxon

<b>Média de levedura aderidas/ingeridas por neutrófilo</b>				
Grupos	n	mediana	quartis	extremos
Controle	20	3,1	2,16 - 3,75	1,68 - 6,13
Zidovudina	20	2,94	2,34 - 3,87	1,57 - 4,72

p=0,769, teste t pareado

<b>Percentual de neutrófilos envolvidos na fagocitose</b>				
Grupos	n	mediana	quartis	extremos
Controle	20	86,5	74,5 - 92,0	64,5 - 97,5
Zidovudina	20	86,5	74,75 - 93,75	63,0 - 99,0

p=0,868, teste t pareado.

## TABELA 8

Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos de indivíduos normais com lamivudina sobre a capacidade fagocitária para  $2,5 \times 10^5$  *Saccharomyces cerevisiae* sensibilizadas por escavação.

<b>Índice fagocitário</b>			
Grupos	n	média	desvio-padrão
Controle	20	269,0	124,1
Lamivudina	20	260,4	82,91

p=0,724, teste t pareado

<b>Média de leveduras ingeridas/aderidas por neutrófilo</b>			
Grupos	n	média	desvio-padrão
Controle	20	3,12	1,19
Lamivudina	20	3,01	0,78

p=0,610, teste t pareado

<b>Percentual de neutrófilos envolvidos na fagocitose</b>			
Grupos	n	média	desvio-padrão
Controle	20	83,8	9,83
Lamivudina	20	85,4	8,45

p=0,601, teste t pareado.

## TABELA 9

Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos de indivíduos normais com efavirenz sobre a capacidade fagocitária para  $2,5 \times 10^5$  *Saccharomyces cerevisiae* sensibilizadas por escavação.

<b>Índice fagocitário</b>			
Grupos	n	média	desvio-padrão
Controle	20	269,0	124,1
Efavirenz	20	308,7	110,8

p=0,255, teste t pareado

<b>Média de leveduras ingeridas/aderidas por neutrófilo</b>			
Grupos	n	média	desvio-padrão
Controle	20	3,12	1,19
Efavirenz	20	3,37	1,09

p=0,446, teste t pareado

<b>Percentual de neutrófilos envolvidos na fagocitose</b>			
Grupos	n	média	desvio-padrão
Controle	20	83,8	9,83
Efavirenz	20	90,43	6,31

p=0,020, teste t pareado.

**TABELA 10**

Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos de indivíduos normais com lopinavir/ritonavir sobre a capacidade fagocitária para  $2,5 \times 10^5$  *Saccharomyces cerevisiae* sensibilizadas por escavação.

<b>Índice fagocitário</b>				
Grupos	n	mediana	quartis	extremos
Controle	20	245,3	167,7 - 340,9	119,3 - 573,2
Lopinavir/ritonavir 30 min	20	240,4	205,2 - 334,9	119,2 - 534,3
Lopinavir/ritonavir 60 min	20	212,3	156,3 - 279,5	121,2 - 404,8

30 min p=0,582, teste de Wilcoxon; 60 min p=0,161, teste t pareado

<b>Média de levedura aderidas/ingeridas por neutrófilo</b>				
Grupos	n	Mediana	quartis	extremos
Controle	20	3,1	2,16 - 3,75	1,68 - 6,13
Lopinavir/ritonavir 30 min	20	2,74	2,28 - 3,72	1,74 - 5,48
Lopinavir/ritonavir 60 min	20	2,54	2,07 - 3,24	1,66 - 4,19

30 min p=0,830, teste de Wilcoxon; 60 min p=0,135, teste t pareado

<b>Percentual de neutrófilos envolvidos na fagocitose</b>				
Grupos	n	Mediana	quartis	extremos
Controle	20	86,5	74,5 - 92,0	64,5 - 97,5
Lopinavir/ritonavir 30 min	20	89,0	79,5 - 93,5	63,5 - 97,5
Lopinavir/ritonavir 60 min	20	86,75	74,0 - 90,75	58,5 - 98,5

30 min p=0,070, teste de Wilcoxon; 60 min p=0,864, teste t pareado

**TABELA 11**

Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos de indivíduos normais com zidovudina, lamivudina e efavirenz sobre a capacidade fagocitária para  $2,5 \times 10^5$  *Saccharomyces cerevisiae* sensibilizadas por escavação.

<b>Índice fagocitário</b>			
Grupos	n	média	desvio-padrão
Controle	20	269,0	124,1
Zidovudina/lamivudina/efavirenz	20	255,2	98,76

p=0,631, teste t pareado

<b>Média de leveduras ingeridas/aderidas por neutrófilo</b>			
Grupos	n	média	desvio-padrão
Controle	20	3,12	1,19
Zidovudina/lamivudina/efavirenz	20	2,95	0,91

p=0,546, teste t pareado

<b>Percentual de neutrófilos envolvidos na fagocitose</b>			
Grupos	n	média	desvio-padrão
Controle	20	83,8	9,83
Zidovudina/lamivudina/efavirenz	20	85,18	11,27

p=0,626, teste t pareado.

**TABELA 12**

Influência do tratamento *in vitro* de neutrófilos de indivíduos normais com zidovudina, lamivudina e lopinavir/ritonavir sobre a capacidade fagocitária para  $2,5 \times 10^5$  *Saccharomyces cerevisiae* sensibilizadas por escavação.

Grupos	Índice fagocitário			
	n	mediana	quartis	extremos
Controle	20	245,3	167,7 - 340,9	119,3 - 573,2
Zidovudina/lamivudina/ lopinavir/ritonavir 30 min	19	214,4	135,4 - 323,1	83,49 - 411,5
Zidovudina/lamivudina/ lopinavir/ritonavir 60 min	19	201,7	185,3 - 324,7	104,9 - 445,2

30 min p=0,139, teste t pareado; 60 min p=0,381, teste de Wilcoxon

Grupos	Média de levedura aderidas/ingeridas por neutrófilo			
	n	Mediana	quartis	extremos
Controle	20	3,1	2,16 - 3,75	1,68 - 6,13
Zidovudina/lamivudina/ lopinavir/ritonavir 30 min	19	2,45	1,97 - 3,73	1,56 - 4,22
Zidovudina/lamivudina/ lopinavir/ritonavir 60 min	19	2,5	2,26 - 3,44	1,38 - 4,64

30 min p=0,181, teste t pareado; 60 min p=0,251, teste t pareado

Grupos	Percentual de neutrófilos envolvidos na fagocitose			
	n	Mediana	quartis	extremos
Controle	20	86,5	74,5 - 92,0	64,5 - 97,5
Zidovudina,lamivudina/ lopinavir/ritonavir 30 min	18	86,0	73,0 - 92,25	59,5 - 99,0
Zidovudina/lamivudina/ lopinavir/ritonavir 60 min	19	83,5	81,0 - 91,5	64,5 - 98,5

30 min p=0,533, teste t pareado; 60 min p=0,434, teste t pareado

**TABELA 13**

Influência do tratamento *in vitro* de monócitos de indivíduos normais com zidovudina sobre a capacidade fagocitária para  $2,5 \times 10^5$  *Saccharomyces cerevisiae* não sensibilizadas por escavação.

<b>Índice fagocitário</b>			
Grupos	n	média	desvio-padrão
Controle	19	59,26	29,35
Zidovudina	19	71,74	32,44

p=0,097, teste t pareado

<b>Média de leveduras ingeridas/aderidas por neutrófilo</b>			
Grupos	n	média	desvio-padrão
Controle	19	1,63	0,22
Zidovudina	20	1,77	0,38

p=0,305, teste t pareado

<b>Percentual de neutrófilos envolvidos na fagocitose</b>			
Grupos	n	média	desvio-padrão
Controle	19	34,76	14,73
Zidovudina	19	41,11	17,78

p=0,051, teste t pareado.

**TABELA 14**

Influência do tratamento *in vitro* de monócitos de indivíduos normais com lamivudina sobre a capacidade fagocitária para  $2,5 \times 10^5$  *Saccharomyces cerevisiae* não sensibilizadas por escavação.

<b>Índice fagocitário</b>			
Grupos	n	média	desvio-padrão
Controle	19	59,26	29,35
Lamivudina	20	70,55	34,77

p=0,182, teste t pareado

<b>Média de leveduras ingeridas/aderidas por neutrófilo</b>			
Grupos	n	média	desvio-padrão
Controle	19	1,63	0,22
Lamivudina	20	1,77	0,38

p=0,305, teste t pareado

<b>Percentual de neutrófilos envolvidos na fagocitose</b>			
Grupos	n	média	desvio-padrão
Controle	19	34,76	14,73
Lamivudina	19	38,13	13,18

p=0,174, teste t pareado.

**TABELA 15**

Influência do tratamento *in vitro* de monócitos de indivíduos normais com efavirenz sobre a capacidade fagocitária para  $2,5 \times 10^5$  *Saccharomyces cerevisiae* não sensibilizadas por escavação.

<b>Índice fagocitário</b>			
Grupos	n	média	desvio-padrão
Controle	19	59,26	29,35
Efavirenz	20	59,54	40,88

p=0,829, teste t pareado

<b>Média de leveduras ingeridas/aderidas por neutrófilo</b>			
Grupos	n	média	desvio-padrão
Controle	19	1,63	0,22
Efavirenz	20	1,72	0,24

p=0,294, teste t pareado

<b>Percentual de neutrófilos envolvidos na fagocitose</b>			
Grupos	n	média	desvio-padrão
Controle	19	34,76	14,73
Efavirenz	20	33,55	20,44

p=0,960, teste t pareado.

**TABELA 16**

Influência do tratamento *in vitro* de monócitos de indivíduos normais com lopinavir/ritonavir sobre a capacidade fagocitária para  $2,5 \times 10^5$  *Saccharomyces cerevisiae* não sensibilizadas por escavação.

<b>Índice fagocitário</b>			
Grupos	n	média	desvio-padrão
Controle	19	59,26	29,35
Lopinavir/ritonavir 30 min	20	85,56	41,79
Lopinavir/ritonavir 60 min	18	37,99	25,29

30 min p=0,003, teste t pareado; 60 min p=0,01, teste t pareado

<b>Média de leveduras ingeridas/aderidas por neutrófilo</b>			
Grupos	n	média	desvio-padrão
Controle	19	1,63	0,22
Lopinavir/ritonavir 30 min	20	1,88	0,44
Lopinavir/ritonavir 60 min	20	1,61	0,27

30 min p=0,004, teste t pareado; 60 min p=0,804, teste t pareado

<b>Percentual de neutrófilos envolvidos na fagocitose</b>			
Grupos	n	média	desvio-padrão
Controle	19	34,76	14,73
Lopinavir/ritonavir 30 min	20	43,7	14,88
Lopinavir/ritonavir 60 min	18	23,47	13,98

30 min p=0,016, teste t pareado; 60 min p=0,013, teste t pareado

**TABELA 17**

Influência do tratamento *in vitro* de monócitos de indivíduos normais com zidovudina, lamivudina e efavirenz sobre a capacidade fagocitária para  $2,5 \times 10^5$  *Saccharomyces cerevisiae* não sensibilizadas por escavação.

<b>Índice fagocitário</b>			
Grupos	n	média	desvio-padrão
Controle	19	59,26	29,35
Zidovudina/lamivudina/efavirenz	20	54,86	40,88

p=0,818, teste t pareado

<b>Média de leveduras ingeridas/aderidas por neutrófilo</b>			
Grupos	n	média	desvio-padrão
Controle	19	1,63	0,22
Zidovudina/lamivudina/efavirenz	20	1,59	0,28

p=0,736, teste t pareado

<b>Percentual de neutrófilos envolvidos na fagocitose</b>			
Grupos	n	média	desvio-padrão
Controle	19	34,76	14,73
Zidovudina/lamivudina/efavirenz	19	32,0	19,4

p=0,731, teste t pareado.

**TABELA 18**

Influência do tratamento *in vitro* de monócitos de indivíduos normais com zidovudina, lamivudina e lopinavir/ritonavir sobre a capacidade fagocitária para  $2,5 \times 10^5$  *Saccharomyces cerevisiae* não sensibilizadas por escavação.

<b>Índice fagocitário</b>			
Grupos	n	média	desvio-padrão
Controle	19	59,26	29,35
Zidovudina/lamivudina/ lopinavir/ritonavir 30 min	19	88,25	50,25
Zidovudina/lamivudina/ lopinavir/ritonavir 60 min	19	62,57	32,66

30 min p=0,008, teste t pareado; 60 min p=0,481, teste t pareado

<b>Média de leveduras ingeridas/aderidas por neutrófilo</b>			
Grupos	n	Média	desvio-padrão
Controle	19	1,63	0,22
Zidovudina/lamivudina/ lopinavir/ritonavir 30 min	19	1,93	0,33
Zidovudina/lamivudina/ lopinavir/ritonavir 60 min	19	1,67	0,29

30 min p=0,003, teste t pareado; 60 min p=0,559, teste t pareado

<b>Percentual de neutrófilos envolvidos na fagocitose</b>			
Grupos	n	média	desvio-padrão
Controle	19	34,76	14,73
Zidovudina/lamivudina/ lopinavir/ritonavir 30 min	19	44,0	20,48
Zidovudina/lamivudina/ lopinavir/ritonavir 60 min	19	36,37	16,73

30 min p=0,015, teste t pareado; 60 min p=0,474, teste t pareado

**TABELA 19**

Influência do tratamento *in vitro* de monócitos de indivíduos normais com zidovudina sobre a capacidade fagocitária para  $2,5 \times 10^5$  *Saccharomyces cerevisiae* sensibilizadas por escavação.

<b>Índice fagocitário</b>			
Grupos	n	média	desvio-padrão
Controle	20	193,4	71,56
Zidovudina	20	195,0	93,96

p=0,918, teste t pareado

<b>Média de leveduras ingeridas/aderidas por neutrófilo</b>			
Grupos	n	média	desvio-padrão
Controle	20	2,52	0,66
Zidovudina	20	2,46	0,75

p=0,706, teste t pareado

<b>Percentual de neutrófilos envolvidos na fagocitose</b>			
Grupos	n	média	desvio-padrão
Controle	20	75,3	12,92
Zidovudina	20	75,65	16,50

p=0,910, teste t pareado.

**TABELA 20**

Influência do tratamento *in vitro* de monócitos de indivíduos normais com lamivudina sobre a capacidade fagocitária para  $2,5 \times 10^5$  *Saccharomyces cerevisiae* sensibilizadas por escavação.

<b>Índice fagocitário</b>			
Grupos	n	média	desvio-padrão
Controle	20	193,4	71,56
Lamivudina	20	200,4	78,54

p=0,444, teste t pareado

<b>Média de leveduras ingeridas/aderidas por neutrófilo</b>			
Grupos	n	média	desvio-padrão
Controle	20	2,52	0,66
Lamivudina	20	2,50	0,70

p=0,838, teste t pareado

<b>Percentual de neutrófilos envolvidos na fagocitose</b>			
Grupos	n	média	desvio-padrão
Controle	20	75,3	12,92
Lamivudina	20	78,30	13,95

p=0,166, teste t pareado.

**TABELA 21**

Influência do tratamento *in vitro* de monócitos de indivíduos normais com efavirenz sobre a capacidade fagocitária para  $2,5 \times 10^5$  *Saccharomyces cerevisiae* sensibilizadas por escavação.

<b>Índice fagocitário</b>			
Grupos	n	média	desvio-padrão
Controle	20	193,4	71,56
Efavirenz	20	218,9	78,66

p=0,124, teste t pareado

<b>Média de leveduras ingeridas/aderidas por neutrófilo</b>			
Grupos	n	média	desvio-padrão
Controle	20	2,52	0,66
Efavirenz	20	2,75	0,80

p=0,167, teste t pareado

<b>Percentual de neutrófilos envolvidos na fagocitose</b>			
Grupos	n	média	desvio-padrão
Controle	20	75,3	12,92
Efavirenz	20	78,3	7,82

p=0,314, teste t pareado.

**TABELA 22**

Influência do tratamento *in vitro* de monócitos de indivíduos normais com lopinavir/ritonavir sobre a capacidade fagocitária para  $2,5 \times 10^5$  *Saccharomyces cerevisiae* sensibilizadas por escavação.

<b>Índice fagocitário</b>				
Grupos	n	mediana	quartis	extremos
Controle	20	196,6	136,2 - 231,2	97,18 - 370,2
Lopinavir/ritonavir 30 min	20	171,7	143,1 - 210,0	89,40 - 377,4
Lopinavir/ritonavir 60 min	18	146,1	117,2 - 165,1	68,15 - 214,9

30 min p=0,830, teste de Wilcoxon; 60 min p=0,020, teste t pareado

<b>Média de levedura aderidas/ingeridas por monócito</b>				
Grupos	n	Mediana	quartis	extremos
Controle	20	2,39	1,92 - 2,78	1,69 - 4,16
Lopinavir/ritonavir 30 min	20	2,35	2,02 - 2,50	1,58 - 5,12
Lopinavir/ritonavir 60 min	19	2,09	1,82 - 2,24	1,45 - 3,94

30 min p=0,947, teste de Wilcoxon; 60 min p=0,045, teste de Wilcoxon

<b>Percentual de monócitos envolvidos na fagocitose</b>				
Grupos	n	Mediana	quartis	extremos
Controle	20	79,5	59,5 - 86,0	50,5 - 93,0
Lopinavir/ritonavir 30 min	20	73,25	68,0 - 81,25	56,5 - 92,5
Lopinavir/ritonavir 60 min	19	70,0	58,5 - 79,0	47,0 - 89,5

30 min p=0,870, teste t pareado; 60 min p=0,232, teste t pareado

### TABELA 23

Influência do tratamento *in vitro* de monócitos de indivíduos normais com zidovudina, lamivudina e efavirenz sobre a capacidade fagocitária para  $2,5 \times 10^5$  *Saccharomyces cerevisiae* sensibilizadas por escavação.

<b>Índice fagocitário</b>				
Grupos	n	Mediana	quartis	extremos
Controle	20	196,6	136,2 - 231,2	97,18 - 370,2
Zidovudina/lamivudina/efavirenz	20	197,8	136,5 - 237,5	76,0 - 322,7

p=0,980, teste t pareado

<b>Média de leveduras ingeridas/aderidas por monócito</b>				
Grupos	n	mediana	quartis	extremos
Controle	20	2,39	1,92 - 2,78	1,69 - 4,16
Zidovudina/lamivudina/efavirenz	20	2,47	1,91 - 2,7	1,52 - 3,96

p=0,839, teste t pareado

<b>Percentual de monócitos envolvidos na fagocitose</b>				
Grupos	n	mediana	quartis	extremos
Controle	20	79,5	59,5 - 86,0	50,5 - 93,0
Zidovunina/lamivudina/efavirenz	20	80,0	70,0 - 83,5	50,0 - 88,5

p=0,801, teste de Wilcoxon

**TABELA 24**

Influência do tratamento *in vitro* de monócitos de indivíduos normais com zidovudina, lamivudina e lopinavir/ritonavir sobre a capacidade fagocitária para  $2,5 \times 10^5$  *Saccharomyces cerevisiae* sensibilizadas por escavação.

Grupos	Índice fagocitário			
	n	mediana	quartis	extremos
Controle	20	196,6	136,2 - 231,2	97,18 - 370,2
Zidovudina/lamivudina/ lopinavir/ritonavir 30 min	19	170,8	146,9 - 208,8	78,0 - 266,2
Zidovudina/lamivudina/ lopinavir/ritonavir 60 min	18	147,5	110,8 - 216,6	82,23 - 304,8

30 min p=0,260, teste t pareado; 60 min p=0,327, teste t pareado

Grupos	Média de levedura aderidas/ingeridas por monócito			
	n	Mediana	quartis	extremos
Controle	20	2,39	1,92 - 2,78	1,69 - 4,16
Zidovudina/lamivudina/ lopinavir/ritonavir 30 min	19	2,34	1,92 - 2,66	1,48 - 3,35
Zidovudina/lamivudina/ lopinavir/ritonavir 60 min	18	2,0	1,74 - 2,61	1,43 - 3,65

30 min p=0,214, teste t pareado; 60 min p=0,132, teste t pareado

Grupos	Percentual de monócitos envolvidos na fagocitose			
	n	Mediana	quartis	extremos
Controle	20	79,5	59,5 - 86,0	50,5 - 93,0
Zidovudina,lamivudina/ lopinavir/ritonavir 30 min	19	76,5	71,5 - 80,0	50,0 - 87,0
Zidovudina/lamivudina/ lopinavir/ritonavir 60 min	18	77,5	60,5 - 83,5	54,5 - 95,5

30 min p=0,768, teste de Wilcoxon; 60 min p=0,962, teste t pareado

## TABELA 25

Influência do tratamento *in vitro* de fagócitos de indivíduos normais com zidovudina sobre o percentual de células que reduziram o NBT.

<b>Percentual de fagócitos que reduziram o NBT basal</b>			
Grupos	n	média	desvio-padrão
Controle	20	86,0	6,9
Zidovudina	19	83,68	12,35

p=0,386, teste t pareado

<b>Percentual de fagócitos que reduziram o NBT estimulado</b>			
Grupos	n	média	desvio-padrão
Controle	20	83,33	8,88
Zidovudina	20	77,48	13,42

p=0,027, teste t pareado

## TABELA 26

Influência do tratamento *in vitro* de fagócitos de indivíduos normais com lamivudina sobre o percentual de células que reduziram o NBT.

<b>Percentual de fagócitos que reduziram o NBT basal</b>			
Grupos	n	média	desvio-padrão
Controle	20	86,0	6,9
Lamivudina	20	80,73	13,80

p=0,071, teste t pareado

<b>Percentual de fagócitos que reduziram o NBT estimulado</b>			
Grupos	n	média	desvio-padrão
Controle	20	83,33	8,88
Lamivudina	20	75,05	14,61

p=0,004, teste t pareado

## TABELA 27

Influência do tratamento *in vitro* de fagócitos de indivíduos normais com efavirenz sobre o percentual de células que reduziram o NBT.

<b>Percentual de fagócitos que reduziram o NBT basal</b>				
Grupos	n	mediana	quartis	extremos
Controle	20	87,5	82,5 - 90,75	70,0 - 97,5
Efavirenz	20	89,0	84,5 - 96,75	78,0 - 99,5

p=0,071, teste de Wilcoxon

<b>Percentual de fagócitos que reduziram o NBT estimulado</b>				
Grupos	n	mediana	quartis	extremos
Controle	20	85,0	77,0 - 90,5	65,5 - 97,5
Efavirenz	20	83,75	76,0 - 89,0	56,0 - 99,0

p=0,626, teste t pareado

## TABELA 28

Influência do tratamento *in vitro* de fagócitos de indivíduos normais com lopinavir/ritonavir sobre o percentual de células que reduziram o NBT.

<b>Percentual de fagócitos que reduziram o NBT basal</b>			
Grupos	n	média	desvio-padrão
Controle	20	86,0	6,9
Lopinavir/ritonavir	20	68,18	19,95

p=0,0007, teste t pareado

<b>Percentual de fagócitos que reduziram o NBT estimulado</b>			
Grupos	n	média	desvio-padrão
Controle	20	83,33	8,88
Lamivudina	20	70,8	13,97

p=0,0001, teste t pareado

## TABELA 29

Influência do tratamento *in vitro* de fagócitos de indivíduos normais com zidovudina, lamivudina e efavirenz sobre o percentual de células que reduziram o NBT.

<b>Percentual de fagócitos que reduziram o NBT basal</b>				
Grupos	n	mediana	quartis	extremos
Controle	20	87,5	82,5 - 90,75	70,0 - 97,5
Zidovudina/lamivudina/efavirenz	20	92,0	79,0 - 95,0	57,0 - 97,0

p=0,911, teste de Wilcoxon

<b>Percentual de fagócitos que reduziram o NBT estimulado</b>				
Grupos	n	mediana	quartis	extremos
Controle	20	85,0	77,0 - 90,5	65,5 - 97,5
Zidovudina/lamivudina/efavirenz	20	80,0	72,75 - 87,75	62,0 - 98,0

p=0,320, teste t pareado

**TABELA 30**

Influência do tratamento *in vitro* de fagócitos de indivíduos normais com zidovudina, lamivudina e lopinavir/ritonavir sobre o percentual de células que reduziram o NBT.

<b>Percentual de fagócitos que reduziram o NBT basal</b>			
Grupos	N	média	desvio-padrão
Controle	20	86,0	6,9
Zidovudina/lamivudina/lopinavir/ritonavir	20	68,58	15,55

P<0,0001, teste t pareado

<b>Percentual de fagócitos que reduziram o NBT estimulado</b>			
Grupos	n	média	desvio-padrão
Controle	20	83,33	8,88
Zidovudina/lamivudina/lopinavir/ritonavir	20	69,45	15,0

p=0,0001, teste t pareado

