



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

TAMIRES FLAUZINO

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O STATUS DE VITAMINA D E MARCADORES
IMUNOLÓGICOS, VIROLÓGICOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM
PACIENTES INFECTADOS PELO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA**

HUMANA TIPO 1

TAMIRES FLAUZINO

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O STATUS DE VITAMINA D E MARCADORES
IMUNOLÓGICOS, VIROLÓGICOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM
PACIENTES INFECTADOS PELO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA**

HUMANA TIPO 1

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Edna Maria Vissoci Reiche

Londrina
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Flauzino, Tamires.

Associação entre o status de vitamina D e marcadores imunológicos, virológicos e de estresse oxidativo em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana tipo 1 / Tamires Flauzino. - Londrina, 2016.

85 f. : il.

Orientador: Edna Maria Vissoci Reiche.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2016.
Inclui bibliografia.

1. HIV (Vírus) - Tese. 2. Vitamina D - Tese. 3. Estresse oxidativo - Tese. I. Reiche, Edna Maria Vissoci. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

TAMIRES FLAUZINO

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O STATUS DE VITAMINA D E MARCADORES
IMUNOLÓGICOS, VIROLÓGICOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES
INFECTADOS PELO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA TIPO 1**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa Dra. Edna Maria Vissoci Reiche
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Jaqueline Dario Capobiango
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dra. Elaine Regina Delicato de Almeida
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa Dra. Andrea Name Colado Simão
Universidade Estadual de Londrina – UEL
(SUPLENTE)

Prof. Dr. Marcell Alysson Batisti Lozovoy
Universidade Estadual de Londrina – UEL
(SUPLENTE)

Londrina, 29 de março de 2016.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus que me deu condições para realizar esse trabalho e aos meus pais, que acreditaram no meu potencial e não mediram esforços para que eu continuasse a estudar.

À minha querida orientadora Dra. Edna Maria Vissoci Reiche, a quem tenho um profundo respeito, carinho e admiração pela grande sabedoria, que é minha orientadora desde a graduação, que sempre foi uma inspiração como professora e orientadora, e que possibilitou o desenvolvimento e conclusão desta dissertação. Muito obrigada por todos esses anos juntas e pelos próximos que estão por vir.

À professora Dra. Andrea Name Colado Simão, que foi minha co-orientadora durante o mestrado e que teve participação essencial no desenvolvimento desse trabalho, a quem sou grata e tenho uma imensa admiração por todo trabalho que ela desenvolve.

Às professoras Dra. Elaine Regina Delicato de Almeida e Dra. Helena Kaminami Morimoto, que iniciaram esse trabalho desde a etapa de coleta de materiais biológicos e nas entrevistas com os pacientes.

Ao professor Dr. Marcell Alysson Batisti Lozovoy que sempre está presente no laboratório e contribuiu para a minha formação durante o mestrado.

Às amigas Ana Paula Kallaur, Sayonara Rangel Oliveira, Franciele Delongui, Nicole Stadtlober, Lorena Flor da Rosa, Rafaele Tirolla e em especial minha parceira Daniela Frizon Alfieri pela amizade, pela contribuição durante todo o mestrado e pelos bons momentos juntas.

Aos alunos do nosso grupo de pesquisa e do Laboratório do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste projeto.

Aos funcionários do Setor de Imunologia Clínica do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário de Londrina, pela colaboração durante todo o mestrado.

Muito obrigada a todos!!!

FLAUZINO, Tamires. **Associação entre o status de vitamina D e marcadores imunológicos, virológicos e de estresse oxidativo em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana tipo 1.** 2016. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2016.

RESUMO

Introdução: A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) provoca uma inflamação crônica e estresse oxidativo, que têm sido implicados na progressão da doença, assim como no desenvolvimento de outras doenças secundárias. A deficiência de vitamina D é comum na população em geral e em pacientes infectados pelo HIV-1 e tem sido associada com progressão da doença. No entanto, o papel da vitamina D na contagem de células T CD4⁺ e carga viral são contraditórios. Além disto, o papel antioxidant da vitamina D na modulação do estresse oxidativo na infecção pelo HIV-1 tem sido pouco explorado.

Objetivo: Avaliar a associação entre níveis de vitamina D e os marcadores imunológicos, virológicos e de estresse oxidativo em pacientes infectados pelo HIV-1. **Metodologia:** O estudo foi realizado com 314 pacientes infectados pelo HIV-1 e 127 indivíduos não infectados controlados por idade, sexo, etnia e índice de massa corpórea. Entre os pacientes, 219 (69,7%) estavam em terapia antirretroviral de alta potência (HAART) e 95 (30,3%) não receberam HAART. A vitamina D foi avaliada pelos valores de 25-hidroxivitamina D [25(OH)D] utilizando imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência. Os indivíduos foram classificados de acordo com os níveis de 25(OH)D em dois subgrupos: vitamina D suficiente ($\geq 30,0 \text{ ng/dL}$) e vitamina D deficiente ($< 30,0 \text{ ng/mL}$). Os marcadores de estresse oxidativo avaliados foram hidroperóxidos lipídicos por quimioluminescência induzida por terc-butil, produtos avançados de oxidação proteica (AOPP) e proteína carbonílica por espectrofotometria, dosagem dos metabólitos de óxido nítrico (NOx) pela reação de Griess, capacidade antioxidant total do plasma pelo método de *Total radical-trapping antioxidant parameter* (TRAP) e determinação dos grupamentos sulfidrila de proteínas por espectrofotometria. Foram determinadas a carga viral do HIV-1 pelo método de branched DNA e a contagem de células T CD4⁺ e T CD8⁺ por citometria de fluxo. Na análise estatística foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov para avaliar a normalidade de distribuição das variáveis. Transformações logarítmicas de dados contínuos foram utilizadas nas análises quando as variáveis não apresentaram distribuição normal. A associação entre os status de vitamina D em pacientes infectados pelo HIV-1 e os marcadores imunológicos e virológicos foi avaliada utilizando a regressão logística binária, controlados para covariáveis que podem confundir a associação de interesse. Análises de regressão logística multinomial foram utilizadas para definir as variáveis significativas do status de vitamina D em pacientes infectados pelo HIV-1 e controles utilizando as variáveis que se mostraram com valores de $p < 0,10$. A significância estatística foi definida como $p < 0,05$. **Resultados:** Os níveis de 25(OH)D e o status de vitamina D não diferiram entre pacientes infectados pelo HIV-1 e controles. Os níveis de hidroperóxidos e AOPP estavam elevados em pacientes infectados pelo HIV-1 quando comparado aos controles ($p < 0,0001$ e $p = 0,002$, respectivamente), enquanto que os níveis de TRAP, proteína carbonílica e NOx estavam diminuídos ($p < 0,0001$). Independente da etnia e uso da HAART, pacientes infectados pelo HIV-1 com deficiência de vitamina D demonstraram maior nível de hidroperóxido quando comparado com os pacientes com

níveis suficientes de vitamina D ($p=0,012$) e controles ($p=0,022$). A proteína carbonílica estava diminuída em pacientes com status deficiente de vitamina D comparado aos controles ($p=0,039$), e não diferiu dos pacientes com status de vitamina D suficiente. Além disso, pacientes com status deficiente e insuficiente demonstraram níveis diminuídos de NOx ($p=0,003$ e $p=0,007$, respectivamente) e TRAP ($p=0,001$) comparado aos controles com status suficiente. No entanto, os valores de NOx e TRAP nos pacientes não diferiram entre os status de vitamina D. A deficiência de vitamina D foi associada com uso de HAART em geral ($p=0,001$) e com terapias que incluíam os inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeo (NRTIs) e inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos (NNRTI) ($p=0,001$ e $p<0,0001$, respectivamente). Níveis elevados de carga viral do HIV-1 foram independentemente associados com status suficiente de vitamina D ($p=0,001$).

Conclusão: Os resultados demonstram que a deficiência de vitamina D em pacientes infectados pelo HIV-1 está associada com aumento na lipoperoxidação; por outro lado, o status suficiente está associado com níveis elevados de carga viral do HIV-1. Estes resultados devem ser explorados com maior número de amostras para melhor elucidar o papel da vitamina D na fisiopatologia e progressão da doença na infecção pelo HIV-1.

Palavras-chave: Vírus da imunodeficiência humana. Deficiência de vitamina D. 25-hidroxivitamina D3. Estresse oxidativo. Carga viral.

FLAUZINO, Tamires. **Association between vitamin D status and immunological, virological, and oxidative stress markers in human immunodeficiency virus type 1-infected patients.** 2016. 85 p. Dissertation (Master's Degree Dissertation in Health Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2016.

ABSTRACT

Introduction: Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection causes a chronic inflammation and oxidative stress, which has been implicated in disease progression, as well as in developing other secondary disorders. Vitamin D deficiency is common in general population as well as in HIV-1-infected patients and have been associated with HIV-1 disease progression. However, the role of vitamin D in CD4⁺ T cell counts and viral load are conflicting. Moreover, the antioxidant role of vitamin D in modulating the oxidative stress in HIV-1 infection has been less explored. **Objective:** Evaluate the association between vitamin D status and immunological, virological, and oxidative stress markers in patients with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection. **Methods:** A study was carried out with 314 HIV-1-infected and 127 HIV-1 non-infected individuals, age, sex, ethnicity, and body mass index controlled. Among the patients, 219 (69.7%) were on highly active antiretroviral therapy (HAART) and 95 (30.3%) were HAART naïve. Vitamin D was evaluated by serum levels of 25 hydroxyvitamin D [25(OH)D] was determined using chemiluminescence assay. The subjects were classified according to levels of 25(OH)D into two subgroups: ≥30 ng/mL were defined as vitamin D sufficient and <30 ng/mL as vitamin D deficient status. The oxidative stress were evaluated by plasma levels of lipid hydroperoxides using tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence, advanced oxidation protein products (AOPP) and carbonyl protein by spectrophotometry, nitric oxide metabolites (NOx) according to the Griess reaction, total antioxidant capacity using total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP), and sulfhydryl groups of proteins by spectrophotometry. The plasma HIV-1 RNA viral load was quantified using branched DNA (bDNA) and CD4⁺/CD8⁺ T cell counts were determined using flow cytometry. For statistical analyses, the Kolmogorov-Smirnov test was used to assess normality of distribution. Logarithmic (Ln) transformation of continuous data was used in the analyses when the variables were not normally distributed or when there was heterogeneity of variance (as assessed with the Levene test). The association between vitamin D status in HIV-infected patients and the immunological and virological markers was evaluated using binary logistic regression analysis with controlled for covariates that may confound the association of interest. Multinomial logistic regression analyses was used to define the significant associations of vitamin D status in HIV-1-infected patients and controls using the biomarkers with p value <0.10. Significance was defined as p<0.05. **Results:** The 25(OH)D levels and vitamin D status did not differ between HIV-1 patients and controls. Hydroperoxides and AOPP were higher (p<0.0001 and p=0.002, respectively) while TRAP, carbonyl protein, and NOx were lower in HIV-1 patients than controls (p<0.0001). Independently of ethnicity and HAART, HIV-1 patients with deficient status showed higher hydroperoxides than those with sufficient status (p=0.012) and controls (p=0.022). Carbonyl protein in patients with vitamin D deficient status was lower than controls (p=0.039), and did not differ between patients with sufficient status. Moreover, patients with deficient and sufficient status showed lower NOx (p=0.003 and p=0.007, respectively) and TRAP (p=0.001)

than controls. HAART, as well as nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) and nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) were associated with deficient status of vitamin D ($p=0.001$, $p=0.001$, and $p<0.0001$, respectively) and higher HIV-1 viral load was independently associated with sufficient status ($p=0.001$). **Conclusion:** The results showed that vitamin D deficient status was associated with increased lipid peroxidation; on the other hand, the sufficient status was associated with high levels of HIV-1 viral load. These results should be explored with large samples to better elucidate the role of vitamin D in the HIV-1 pathophysiology and disease progression.

Keywords: Human immunodeficiency virus. Vitamin D deficiency. 25-hydroxyvitamin D3. Oxidative stress. Viral load.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1,25(OH) ₂ D	<i>1,25-dihydroxyvitamin D</i> - 1,25-dihidroxivitamina D
25(OH)D	<i>25-hydroxyvitamin D</i> – 25-hidroxivitamina D
Aids	Síndrome da imunodeficiência humana adquirida
AOPP	<i>Advanced oxidation protein products</i> - Produtos avançados de oxidação proteíca
ARV	Antirretroviral
AU	Ácido úrico
bDNA	<i>branched DNA</i>
BHE	Barreira hemato encefálica
BMI	<i>Body Mass Index</i> – Índice de massa corpórea
CI	<i>Confidence interval</i> – Intervalo de confiança
CYP24A1	25-hidroxivitamina D-24-hidroxilase
CYP27B1	25-hidroxivitamina D-1 α -hidroxilase
CYP2R1	25-hidroxilase vitamina D
D2	Ergocalciferol
D3	Calciferol
DBP	Proteína ligadora de vitamina D
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTNB	<i>2,2-dithiobisnitrobenzoic acid</i> – 2,2 ditiobisnitrobenzóico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
eNOS	<i>Endothelial nitric oxide synthase</i> - Óxido nítrico sintetase endotelial
ERN	Espécie reativa de nitrogênio
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FRAP	<i>Ferric reducing antioxidant power</i> – Poder antioxidante na redução do ferro
G6PD	glicose-6-fosfato desidrogenase
gp120	Glicoproteína 120
GPx	<i>Glutathione peroxidase</i> - Glutationa peroxidase
GSH	<i>Glutathione reduced</i> - Glutationa reduzida
HAART	<i>Highly active antiretroviral therapy</i> – Terapia antirretroviral de alta potência

H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
HIV-1	<i>Human immunodeficiency virus type 1</i> – Vírus da imunodeficiência humana tipo 1
HNO_2	Ácido nitroso
$HO_2\bullet$	Radical hidroxiperoxila
HU	Hospital Universitário
IC	Intervalo de confiança
ICAM-1	<i>Intracellular adhesion molecule 1</i> – Molécula de adesão intercelular 1
IFN	<i>Interferon</i> – Intérferon
I κ B	Inibidor de <i>kappa</i> B
IL	<i>Interleukin</i> – Interleucina
IMC	Índice de massa corpórea
iNOS	<i>Induced nitric oxide synthase</i> – Óxido nítrico sintetase induzida
Ln	<i>Logarithmic</i> – Logaritmo
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i> – Proteína quinase ativada por mitógenos
MDA	<i>Malondialdehyde</i> – Malondialdeído
MMP	<i>Matrix metalloproteinase</i> – Metaloproteinases de matriz
mRNA	<i>Messenger ribonucleotide acid</i> – Ácido ribonucleotídeo mensageiro
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa B</i> – Fator nuclear <i>kappa</i> B
NK	<i>Natural killer</i>
nNOS	<i>Neuronal nitric oxide synthase</i> – Óxido nítrico sintetase neuronal
NNRTI	<i>Nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors</i> – Inibidor da transcriptase reversa não análogo de nucleosídeo
NO	<i>Nitric oxide</i> - Óxido nítrico
NOx	Metabólitos do óxido nítrico
NO_2^-	<i>Nitrite</i> – Nitrito
NO_3	<i>Nitrate</i> – Nitrato
N_2O_3	Óxido nitroso
NOS	Óxido nítrico sintetase

NRTI	<i>Nucleoside reverse transcriptase inhibitors</i> – Inibidor da transcriptase reversa análogo de nucleosídeo
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
O ₂	Oxigênio
OH•	Radical hidroxila
ONOO ⁻	<i>Peroxynitrite</i> – Peroxinitrito
OR	<i>Odds ratio</i> – razão de chance
PCR	Proteína C reativa
PI	<i>Protease inhibitor</i> – Inibidor de protease
PTH	Hormônio da paratireoide
ROO ⁻	Radical peroxil
rpm	rotações por minuto
RSH ⁺	Radical sulfidrila
RS-NO	Nitrosotiol
SEM	<i>Standard error of mean</i> – Erro padrão da média
SH	<i>Sulfhydryl</i> – Sulfidrila
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
Tat	Proteína transativadora transcricional
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
Th	<i>T helper</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> – Fator de necrose tumoral
TRAP	<i>Total radical-trapping antioxidant parameter</i>
Treg	Linfócito T regulador
UA	<i>Uric acid</i>
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UNAIDS	Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/aids
UVB	Ultravioleta B
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i> – Molécula de adesão celular vascular
VDR	<i>Vitamin D receptor</i> – Receptor de vitamina D
WHO	<i>World Health Organization</i> – Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	INFECÇÃO PELO HIV-1	13
1.1.1	Estresse Oxidativo na Infecção Crônica Pelo HIV-1.....	14
1.2	VITAMINA D	19
1.2.1	Vitamina D e o Sistema Imune	22
1.2.2	Vitamina D e o Estresse Oxidativo	23
1.3	VITAMINA D E INFECÇÃO PELO HIV-1	25
1.3.1	Vitamina D e Terapia Antirretroviral de Alta Potência	30
1.3.2	Vitamina D e Marcadores Imunológicos e Virológicos da Infecção Pelo HIV-1	31
2	JUSTIFICATIVA.....	33
3	OBJETIVOS.....	34
3.1	OBJETIVO GERAL	34
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
4	MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1	ASPECTOS ÉTICOS	35
4.2	DELINAEAMENTO	35
4.3	POPULAÇÃO E AMOSTRA.....	35
4.4	DADOS DEMOGRÁFICOS, EPIDEMIOLÓGICOS, ANTROPOMÉTRICOS E CLÍNICOS	36
4.5	COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO.....	36
4.6	DETERMINAÇÃO DE VITAMINA D	36
4.7	MARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO.....	36
4.7.1	Oxidantes.....	36
4.7.1.1	Peroxidação lipídica.....	36
4.7.1.2	Produtos avançados da oxidação proteica (AOPP)	37
4.7.1.3	Determinação de proteínas carbonílicas.....	37
4.7.1.4	Metabólitos do óxido nítrico (NOx).....	37

4.7.2	Antioxidantes.....	38
4.7.2.1	Capacidade antioxidant total do plasma.....	38
4.7.2.2	Grupamento sulfidrila de proteínas	38
4.8	CONTAGEM DE LINFÓCITOS T CD4+ E CD8+	38
4.9	DETERMINAÇÃO DA CARGA VIRAL PLASMÁTICA DE HIV-1	39
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
5	RESULTADOS	40
5.1	ARTIGO CIENTÍFICO	40
6	CONCLUSÕES.....	66
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	67
REFERÊNCIAS.....		68
ANEXOS		80
ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos.....		81
APÊNDICES		82
APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido		83
APÊNDICE B – Questionário.....		85

1 INTRODUÇÃO

1.1 INFECÇÃO PELO HIV-1

Na década de 1980, surgiram os primeiros casos descritos da síndrome da imunodeficiência adquirida (aids), uma consequência da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) que logo tomaria proporções de epidemia mundial. Segundo último relatório global da Organização Mundial da Saúde (WHO) HIV/aids, estima-se que 37 milhões de pessoas no mundo estão vivendo com o HIV tipo 1 (HIV-1). No ano de 2014, 2 milhões de novos casos foram diagnosticados e 1,5 milhões de pacientes morreram de doenças relacionadas à aids (WHO, 2015). Além disso, aproximadamente 16 milhões de pessoas estão recebendo tratamento antirretroviral, em comparação com 8 milhões de pessoas em 2012. No final de 2014, o UNAIDS estimou que novas infecções pelo HIV-1 tenham caído em 35,0% desde o pico em 2000, e que as mortes relacionadas com a aids tenham caído 42,0% desde o pico de 2004 (WHO, 2015).

Em 1996, com a introdução da terapia antirretroviral de alta potência (*highly active antiretroviral therapy – HAART*) a morbidade e mortalidade associada à infecção pelo HIV-1 têm sido marcadamente diminuídas, tornando a infecção pelo HIV-1 uma doença crônica (ESTRADA et al., 2006; PALELLA et al., 2006). No entanto, tornou-se cada vez mais claro que pacientes infectados pelo HIV-1 ao longo do tempo apresentam um risco aumentado para o desenvolvimento de consequências não relacionadas à infecção pelo HIV-1 por si só. O tratamento antirretroviral (ARV) pode induzir complicações metabólicas graves, tais como resistência à insulina, dislipidemia, síndrome metabólica, obesidade central, lipodistrofia e doenças cardiovasculares (ESTRADA et al., 2006)

A patogênese da infecção pelo HIV-1, em grande parte, é atribuível à diminuição do número de linfócitos T CD4⁺, principal alvo do vírus. O estado imunológico de um paciente infectado pelo HIV-1 pode ser avaliado pela contagem do número absoluto (por mm³) ou da porcentagem de células T CD4⁺, um parâmetro considerado padrão para avaliar e caracterizar a gravidade da imunodeficiência relacionada ao HIV-1 (WHO, 2007). A progressiva diminuição das células T CD4⁺ resulta na desregulação do sistema imunológico que leva a uma falha no mecanismo de homeostasia do hospedeiro e na rede de células do sistema imune. Estas alterações estão associadas com a progressão da doença e uma maior probabilidade de infecções oportunistas e outras manifestações clínicas associadas ao vírus,

incluindo debilitação progressiva e morte (OKOYE; PICKER, 2013; WHO, 2007). De modo típico, depois de sofrer a infecção primária, a maioria dos pacientes não apresenta quaisquer sintomas por até mais de 10 anos, durante os quais a carga viral declina sem que o vírus interrompa sua replicação. Isto, por sua vez, leva a uma diminuição gradativa na contagem de células T CD4⁺ que conduz à aids, denominada como a fase terminal da infecção (RESHI; SU; HONG, 2014).

Após o pico inicial de viremia, respostas imunes humorais e celulares são detectadas e capazes de controlar parcialmente a replicação viral, com a observação de queda da viremia, até atingir um nível de estado estacionário mais baixo. No entanto, estas respostas imunológicas não conseguem eliminar o vírus, levando a uma infecção crônica caracterizada por aumento da resposta Th1 (FÉVRIER; DORGHAM; REBOLLO, 2011). Nessa fase, notam-se níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral (TNF)-α, interleucina (IL)-1, IL-6 e elevação da proteína C reativa (PCR), havendo, também, aumento da produção e da destruição de linfócitos T CD4⁺ e de linfócitos B (BOULWARE et al., 2011; BREEN, 2002; COHEN et al., 2011). Ressalta-se que a ativação dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ é persistente e está associada tanto à presença do HIV-1 quanto a de outros fatores comuns em pessoas vivendo com HIV/aids, como replicação viral, estímulo provocado pela presença de outros patógenos como o citomegalovírus, herpesvírus, translocação de lipopolissacarídeos (LPS) através da mucosa intestinal que se ligam ao CD14 solúvel, perda de células T imunoregulatórias (Treg) Foxp3⁺ e fibrose da infraestrutura linfoide (CERRATO et al., 2015).

1.1.1 Estresse Oxidativo na Infecção Crônica pelo HIV-1

O estresse oxidativo é uma condição caracterizada por um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) e a sua neutralização pelas defesas antioxidantes, resultando em alterações no estado *redox* da célula (DALLE-DONNE, 2006). As ERO são formadas pela redução incompleta do oxigênio, que compreendem ânion superóxido (O_2^-), radical peroxil (ROO^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxiperoxila ($HO_2\cdot$) e radical hidroxila ($\cdot OH$) altamente reagentes (BIRBEN et al., 2012). ERO também podem interagir com o óxido nítrico (NO), um produto da NO sintase (NOS) que geralmente é expressa em grande quantidade durante processos inflamatórios e infecciosos, resultando na conversão de NO em várias ERN, que incluem o óxido nitroso

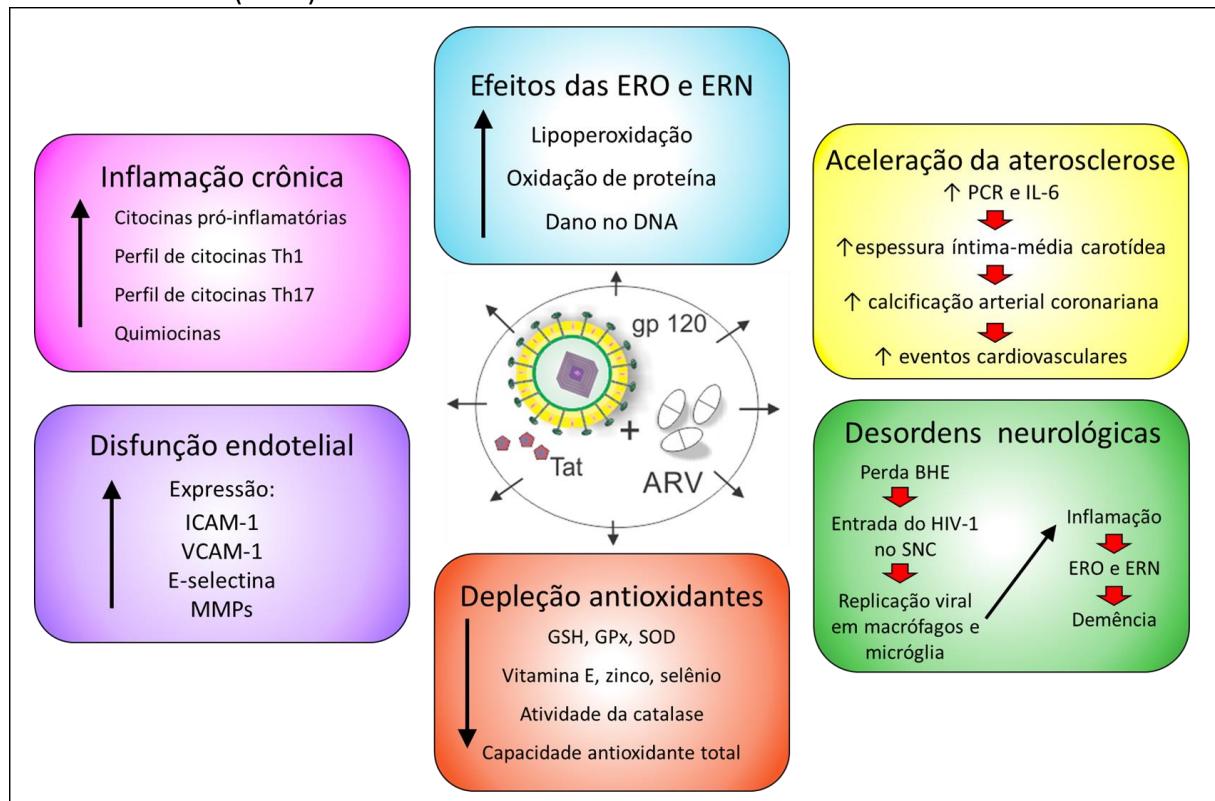
(N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos (ONOO^-) (BECKMAN; KOPPENOL, 1996). Estas ERO e ERN podem agir sobre os componentes biológicos e induzir o processo oxidativo e nitrosativo em lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, o que pode comprometer gravemente a viabilidade das células ou induzir uma variedade de respostas celulares por meio da geração de espécies reativas secundárias, levando à morte celular por necrose ou apoptose (CIRCU; AW, 2010). O dano oxidativo causado por qualquer uma destas biomoléculas, se não for controlado, pode contribuir para o desenvolvimento de doenças; sendo assim, para evitar o processo lesivo, as células e tecidos dos seres vivos possuem abundância de sistemas antioxidantes para neutralizar ou eliminar as ERO e ERN. Estes sistemas incluem enzimas antioxidantes, como a catalase, superóxido dismutase (SOD), glutationa peroxidase (GPx) e glutationa redutase, bem como compostos de baixo peso molecular não enzimáticos, tais como vitamina C, vitamina E, glutationa reduzida (GSH) e ácido úrico (AU) (BIRBEN et al., 2012). Sob circunstâncias fisiológicas, há um equilíbrio entre a formação e a neutralização de ERO e ERN para que haja modificação mínima de biomoléculas (DALLE-DONNE, 2006).

Uma grande variedade de doenças crônicas apresenta estresse oxidativo e nitrosativo como parte da patogênese, incluindo a infecção pelo HIV-1. Evidências sugerem que pacientes infectados pelo HIV-1 estão sob estresse oxidativo crônico, que tem sido implicado na progressão da doença, assim como no desenvolvimento de doenças secundárias, tais como doenças cardiovasculares (JIANG et al., 2009; MASIÁ et al., 2007), disfunção endotelial (KLINE; SUTLIFF, 2008; LIU et al., 2005), síndrome metabólica (MORIMOTO et al., 2014), desordens neurológicos (demência associada ao HIV-1) (AGRAWAL et al., 2010; VISALLI et al., 2007) e complicações oculares (retinopatia) (YU et al., 2008).

As proteínas do HIV-1 tat e gp 120, somados aos vários componentes da HAART contribuem para a formação de ERO e ERN (NGONDI et al., 2006). O acúmulo de ERO e ERN devido ao desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes exercem efeitos sobre lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos, vias de sinalização e células do sistema imune. Pacientes infectados pelo HIV-1 estão sob processo inflamatório crônico, com aumento no perfil de citocinas Th1, Th17 e quimiocinas. As proteínas virais podem ativar várias vias inflamatórias na parede vascular liberando citocinas e aumentando a expressão de moléculas endoteliais, como a molécula de adesão celular vascular (*vascular cellular*

adhesion molecule - VCAM1), molécula de adesão intercelular (*intercellular adhesion molecule* - ICAM 1) e E-selectina causando a disfunção endotelial e risco aumentado para aterosclerose. A entrada do vírus no sistema nervoso central (SNC) gera inflamação e o estresse oxidativo podendo causar desordens neurológicas, como a demência associada ao HIV-1 (figura 1).

Figura 1 – Principais efeitos da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1), tratamento antirretroviral e estresse oxidativo. ARV: antirretroviral; GSH: glutationa; GPx: glutationa peroxidase; SOD: superóxido dismutase; VCAM1: *vascular cellular adhesion molecule*; ICAM 1: *intercellular adhesion molecule*; MMP: metaloproteínases; PCR: proteína C reativa; IL-6: interleucina 6; BHE: barreira hematoencefálica; SNC: sistema nervoso central. Adaptado de: REICHE et al. (2014)



Estudos sugerem que o estresse oxidativo pode estar envolvido em muitos aspectos da patogênese do HIV-1, incluindo aumento da replicação viral e resposta inflamatória, diminuição de linfócitos T CD4⁺, perda da função imune, perda crônica de peso e aumento na sensibilidade à toxicidade do fármaco (STEPHENSON et al., 2005).

Uma consequência relevante da ativação de macrófagos na resposta imune do hospedeiro contra infecções virais, incluindo a infecção pelo HIV-1, é o aumento da produção de NO, um importante radical livre que exerce seus efeitos em processos

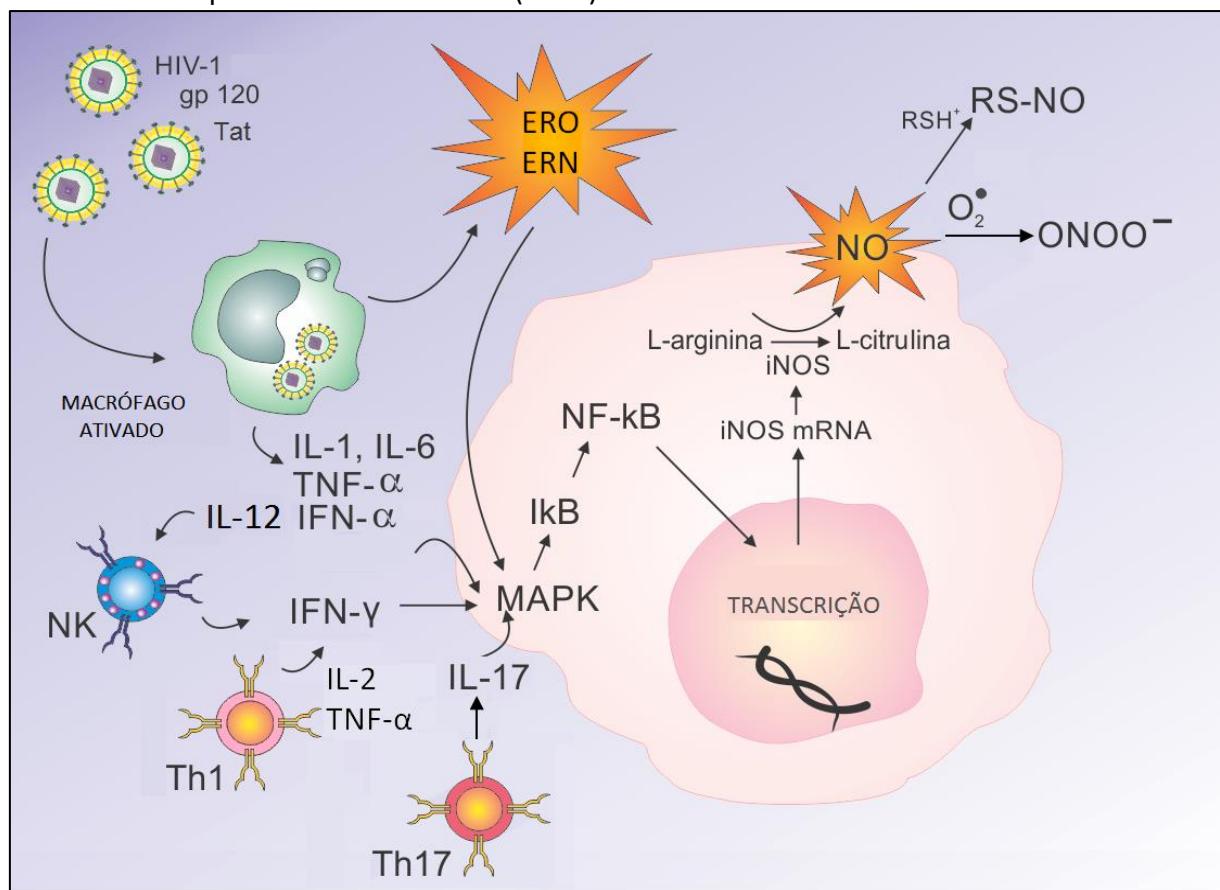
fisiológicos e patológicos (MANNICK, 1995). Três isoformas enzimáticas de NOS são responsáveis pela produção de NO: NO sintase neuronal (nNOS; tipo I), NO sintase induzível (iNOS; tipo II) que é produzida em grandes quantidades por macrófagos e NO sintase endotelial (eNOS; tipo III). Em células endoteliais normais, o aminoácido L-arginina é constitutivamente convertido em L-citrulina e NO pela eNOS. A expressão de iNOS é aumentada pelo estresse oxidativo e citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β , IL-6, interferon (IFN)- α 2b, IFN- γ e IL-17 (NATHAN, 1997). Além disso, as proteínas do HIV-1, como gp120 e tat estimulam a produção de NO em macrófagos (PIETRAFORTE et al., 1994).

Após a entrada do HIV-1 em macrófagos, estas células se tornam ativadas e produzem citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1, IL-6, e IFN- γ). Células *natural killer* (NK) produzem IFN- γ , linfócitos Th1 produzem IL-2, TNF- α e IFN- γ , e linfócitos Th17 produzem IL-17. Todas essas citocinas ativam a via de sinalização MAPK. Nesta via, o fator de transcrição NF-kB está ligado ao I κ B no citoplasma e a forma ativa do NF-kB se transloca para o núcleo e se liga ao DNA para promover a transcrição no gene da iNOS formando NO. A produção excessiva de NO pela iNOS pode contribuir para danos nos tecidos em várias doenças inflamatórias e infecciosas, assim como na patogênese da infecção pelo HIV-1 (RADI, 2004). Embora a produção de NO possa ser aumentada pela iNOS, a biodisponibilidade do NO pode ser prejudicada, pois o NO é consumido na reação com O₂⁻ resultando em uma forte espécie oxidante, o ONOO⁻, que por sua vez acelera a reação de lipoperoxidação (LI et al., 2007; TAO et al., 2007). A produção de ONOO⁻ pode ser estimada pelos níveis elevados de nitrotirosina, um marcador endógeno de sua geração encontrado em modelos humanos e animais (YAMAGUCHI et al., 2006). NO também pode reagir com os radicais sulfidrila de proteínas formando nitrosotiol (figura 2).

Uma vez que o NO é um radical livre muito lábil com uma meia-vida de apenas alguns segundos, é difícil medir seus níveis diretamente no tecido com tempo real, pois ele é rapidamente oxidado pelo oxigênio formando nitrato e nitrito, produtos finais estáveis. Geralmente, os níveis séricos de NO são avaliados com base na concentração de nitrito e nitrato de acordo com a reação de Griess, que consiste na redução enzimática do nitrato em nitrito com cádmio (GUEVARA et al., 1998). Os resultados de NO em pacientes infectados pelo HIV-1 são controversos. Estudos, *in vitro* e *in vivo*, relataram a produção excessiva de NO na presença de infecção pelo HIV-1 (TORRE; PUGLIESE; SPERANZA, 2002). No entanto, Cairoli et al. (2008) demonstraram que o HIV-1 diminui os níveis de NO e a expressão de

iNOS, *in vitro* e *in vivo*.

Figura 2 – Mecanismos de produção de óxido nítrico (NO) e outras moléculas oxidantes induzidas pelo HIV-1 e suas proteínas na promoção de efeitos benéficos na resposta imune contra patógenos e efeitos deletérios nas células do hospedeiro. ERO: espécies reativas de oxigênio; ERN: espécies reativas de nitrogênio; TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa; IL-1: Interleucina 1; IL-2: interleucina 2; IL-6: Interleucina 6; IFN- α : interferon alfa; IFN- γ : interferon gama; NK: natural killer; MAPK: proteína quinase ativada por mitógenos; I κ B: inibidor quinase do fator nuclear kappa B; NF- κ B: fator transcrecional nuclear kappa B; mRNA: RNA mensageiro; iNOS: óxido nítrico sintase induzível. NO: óxido nítrico; O $_2^-$: ânion superóxido; ONOO $^-$: peroxinitrito; RSH $^+$: radical sulfidrila; RS-NO: nitrosotiol. Adaptado de: REICHE et al. (2014)



Vários estudos demonstraram aumento de estresse oxidativo em pacientes infectados pelo HIV-1 (GIL et al., 2003, 2011; PASUPATHI et al., 2009; REPETTO et al., 1996; SURESH et al., 2009; VASSIMON et al., 2010). Gil et al. (2003) demonstram que os níveis de malondialdeído (MDA), hidroperóxidos totais e porcentagem de DNA fragmentado estavam elevados nos pacientes infectados pelo HIV-1 quando comparado aos controles, enquanto que os níveis de GSH, a atividade da GPx e o status antioxidante total estavam diminuídos. Estudos também demonstraram aumento na oxidação de proteínas avaliado pela dosagem

de *advanced oxidation protein products* (AOPP) nos pacientes infectados pelo HIV-1 quando comparado aos indivíduos não infectados (GIL et al., 2011; VASSIMON et al., 2010). Além disso, Gil et al. (2011) demonstraram que o aumento no estresse oxidativo em pacientes infectados pelo HIV-1 está associado com o uso da HAART.

Suresh et al. (2009) demonstraram aumento de estresse oxidativo em pacientes infectados pelo HIV-1 em comparação com indivíduos controles, com aumento da lipoperoxidação mensurada por MDA, diminuição da defesa antioxidante total mensurada por *ferric reducing antioxidant power* (FRAP) e diminuição dos antioxidantes individuais, com a vitamina E, vitamina C e atividade da SOD. Além disso, o estresse oxidativo aumenta com a progressão da infecção pelo HIV-1 (SURESH et al., 2009). Similar aos achados de Pasupathi et al. (2009) que demonstraram o aumento nos níveis de MDA e diminuição das defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas em indivíduos com aids comparado aos infectados pelo HIV-1 e controles.

A diminuição da capacidade antioxidante total em pacientes infectados pelo HIV-1 é provavelmente um resultado do consumo de moléculas antioxidantes na proteção de células contra o dano oxidativo e pode estar relacionado com a progressão da infecção para aids (OGUNRO et al., 2005). A depleção nas defesas antioxidantes pode levar ao aumento da lipoperoxidação (OGUNRO et al., 2005).

Portanto, os principais mecanismos fisiopatológicos envolvidos na infecção pelo HIV-1 e sua progressão são inflamação e estresse oxidativo. Sendo assim, vários estudos têm sido desenvolvidos na busca de moléculas que poderiam modular ambos processos lesivos. Entre estas moléculas, destaca-se a vitamina D pela sua ação anti-inflamatória e antioxidante, além dos efeitos clássicos na hemostasia óssea e mineral.

1.2 VITAMINA D

A vitamina D é um importante hormônio esteroide que regula a atividade gênica de diversos tipos celulares (NAGPAL; NA; RATHNACHALAM, 2005). Nos últimos anos, estudos descreveram os inúmeros benefícios deste hormônio para a saúde humana, além dos efeitos clássicos no metabolismo ósseo (HEWISON, 2012). A obtenção de vitamina D ocorre pela exposição a luz solar, da dieta e da suplementação. A vitamina D existe em duas formas: ergocalciferol (D₂), encontrada em alimentos de origem vegetal como produto da radiação

do ergosterol, calciferol (D3), sintetizada pela epiderme humana pela radiação ultravioleta B (UVB) e mediante ingestão de alimentos de origem animal (LEE et al., 2008). A radiação solar UVB penetra na pele e converte o 7-dehidrocolesterol em pré-vitamina D₃, que é rapidamente convertida em vitamina D₃. A vitamina D derivada da pele e da dieta é metabolizada no fígado pela enzima 25-hidroxilase vitamina D (CYP2R1) em 25-hidroxivitamina D [25(OH)D], o principal metabólito circulante e um marcador utilizado para determinar o status de vitamina D dos indivíduos. 25(OH)D é então hidroxilada novamente, desta vez no carbono 1, ao nível mitocondrial em células dos túbulos proximais renais, bem como em muitos outros tecidos, sob a ação do citocromo 1 α -hidroxilase (CYP27B1), finalmente produzindo a 1,25-diidroxivitamina D3 [1,25 (OH)₂D], a sua forma biologicamente ativa (DELUCA, 2004; HOLICK, 1981). A produção renal de 1,25(OH)₂D é estreitamente regulada pelos níveis plasmáticos do hormônio da paratireoide (PTH) e níveis séricos de cálcio e fósforo. A eficiência na absorção renal de cálcio e intestinal de cálcio e fósforo aumenta na presença de 1,25(OH)₂D (DUSSO et al., 2005). A 25-hidroxivitamina D-24-hidroxilase (CYP24A1) é responsável pelo catabolismo da vitamina D, convertendo a 25(OH)D e 1,25(OH)₂D em sua forma inativa hidrossolúvel (DELUCA, 2004).

A 1,25(OH)₂D não é indicada para monitorização do status de vitamina D devido sua curta meia vida no soro, além de ser convertida, geralmente, a nível tecidual fora da circulação geral e os níveis circulantes podem se apresentar diminuídos, normais ou até elevados frente a níveis baixos de 25(OH)D (HOLICK, 2006; ROSEN, 2011). Os níveis séricos de 25(OH)D têm sido utilizados como marcador do status de vitamina D na população em geral e obtidos por métodos sensíveis e específicos. No entanto, ainda não há um consenso internacional sobre os valores de referência deste hormônio bem como dos valores de corte a serem utilizados na definição de suficiência, insuficiência ou deficiência de vitamina D (MANGIN; SINHA; FINCHER, 2014). O valor de corte de 30 ng/mL ou 75 nmol/L é utilizado pela evidência de indicar que os níveis de produção de PTH e reabsorção de cálcio do osso são minimizados, e a absorção intestinal de cálcio é estabilizada (HOLICK, 2007).

Vários tipos celulares possuem um receptor da vitamina D (VDR) e respondem a 1,25(OH)₂D, incluindo células hematopoiéticas, do sistema imune, epidérmicas, pancreáticas, miócitos, neurônios, cardiomiócitos, células do músculo liso vascular, endoteliais e do tecido placentário, além de osteoblastos, osteoclastos, epiteliais do

intestino delgado e tubulares renais, o que explica a multiplicidade de ações não calcêmicas exercidas pela vitamina D para vários tecidos (DELUCA, 2004; DUSSO et al., 2005). A deficiência de vitamina D foi associada com várias comorbidades, dentre elas hipertensão, doenças cardiovasculares e renais, osteoporose, fratura óssea, fraqueza muscular, resistência à insulina, diabetes, dislipidemia, função imunológica diminuída, doenças infecciosas e autoimunes, e alguns tipos de câncer (FORMAN et al., 2007; GINDE; LIU; CAMARGO JR, 2009; GIOVANNUCCI, 2005; LOOKER et al., 2008; MARTINS, 2007).

Além disso, existem vários tecidos e células que possuem atividade da CYP27B1 e produzem 1,25(OH)₂D (ADAMS; HEWISON, 2008; LIU et al., 2006). A produção local de 1,25(OH)₂D pode ser responsável pela regulação de mais de 200 genes, incluindo os genes responsáveis pela regulação e proliferação celular, diferenciação, apoptose e angiogênese (NAGPAL; NA; RATHNACHALAM, 2005). Esse papel regulador da vitamina D diminui a proliferação de células normais e tumorais e induz sua diferenciação final (DUSSO et al., 2005; NAGPAL; NA; RATHNACHALAM, 2005). A 1,25(OH)₂D inibe o sistema renina-angiotensina (LI, 2003), aumenta a produção de insulina pela ação direta nas células beta do tecido pancreático (CHIU et al., 2004) e aumenta a contratilidade do miocárdio (ZITTERMANN, 2006).

Os níveis sérios de vitamina D são influenciados por vários fatores, tais como sexo, idade, etnia, índice de massa corpórea (IMC), geográficos (latitude), culturais, exposição solar, sazonalidade, hábitos alimentares, dos critérios utilizados para definir deficiência, insuficiência e níveis suficientes de vitamina D, além das variantes genéticas, em especial no gene que codifica o VDR (LIPS, 2006; VAN SCHOOR; LIPS, 2011). Idade avançada, sexo feminino e a raça negra (MELAMED et al., 2008) foram associados com deficiência de vitamina D. Outros importantes fatores que influenciam a biodisponibilidade dos níveis de vitamina D são a proteína ligadora de vitamina D (DBP) e albumina. As formas 25(OH)D e 1,25(OH)D circulam ligadas à DBP (80-90%) e à albumina (10-15%) com <1% presente na sua forma ativa (KONGSBAK et al., 2014).

A hipovitaminose D é uma desordem mundial, com alta prevalência na população em geral tanto de países desenvolvidos como em desenvolvimento. Tem sido estimado que mais de 1 bilhão de pessoas sofrem de deficiência ou insuficiência de 25(OH)D. De acordo com os resultados da National Health and Nutrition Examination Survey

(NHANES), a deficiência e insuficiência de 25(OH)D acometem até 79% dos adultos (NHANES, 2014).

1.2.1 Vitamina D e o Sistema Imune

A vitamina D também é um potente imunomodulador uma vez que o VDR é expresso constitutivamente em macrófagos e células dendríticas e indutivamente em linfócitos ativados. A 1,25(OH)₂D pode ser sintetizada por células apresentadoras de抗ígenos que expressam as enzimas 25-hidroxilase e 1 α -hidroxilase, que permitem a produção de 25(OH)D e 1,25(OH)₂D (WHITE, 2012). A vitamina D exerce tanto efeitos estimulatórios quanto supressivos na resposta imunológica (CHESNEY, 2010). Na resposta imune inata, tem-se observado que a vitamina D aumenta a quimiotaxia e fagocitose de macrófagos, assim como aumenta a produção de peptídeos antimicrobianos, tais como catelicidina e defensina β 2. Monócitos e macrófagos expostos ao LPS ou ao *Mycobacterium tuberculosis* aumentam a expressão do gene do VDR e do gene da 25-hidroxivitamina D-1 α -hidroxilase. O aumento na produção de 1,25(OH)₂D resulta na síntese de catelicidina, um peptídeo capaz de destruir o *Mycobacterium tuberculosis*, assim como outros agentes infecciosos (DUSSO et al., 2005; PENNA et al., 2005). A tuberculose é a principal causa de morte pela aids no mundo (LIU et al., 2006); sendo assim, a vitamina D é de grande importância na resposta imune contra as infecções oportunistas que acometem os pacientes infectados pelo HIV-1. Estudos sugerem que níveis suficientes de vitamina D estão associados com resposta imune mais eficiente contra o *Mycobacterium tuberculosis*, taxa mais rápida de cura bacteriológica e melhores resultados a longo prazo (MARTINEAU et al., 2011a, 2011b; WEJSE et al., 2009).

No que diz respeito ao sistema imune adaptativo, 1,25(OH)₂D estimula a produção de um perfil de citocinas Th2 e o desenvolvimento de células Treg, mas inibe os fenótipos Th1 e Th17, ou seja, inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias. 1,25(OH)₂D reduz a síntese de IFN- γ pela ligação do receptor retinóide X no VDR, uma região silenciadora na região promotora do gene de IFN- γ (ALROY; TOWERS; FREEDMAN, 1995; CIPPITELLI; SANTONI, 1998). Além disso, também exerce efeito anti-inflamatório pela inibição da expressão de IL-6 (XUE et al., 2002), citocina fundamental para a diferenciação das células Th *naïve* em Th17, como também pela supressão da IL-12p70, IL-23p19, levando a uma menor

expressão de mRNA de IL-17 (DANIEL et al., 2007). A vitamina D inibe da síntese da IL-6 pelos monócitos, que é o principal estímulo para a síntese de PCR pelo fígado (ROSTKOWSKA-NADOLSKA et al., 2010; ZHANG et al., 2012). A vitamina D tem um efeito direto nas células B e inibe produção de imunoglobulinas (LEMIRE et al., 1984). Além disso, a diferenciação de linfócitos B é interrompida *in vitro* quando exposta à 1,25(OH)₂D (CHEN et al., 2007).

A deficiência de vitamina D tem sido associada com inflamação na população em geral (HYPPÖNEN et al., 2010). Em pessoas com alto risco cardiovascular, baixo nível de vitamina D tem sido associado com aumento de marcadores inflamatórios e maior probabilidade de morte (DOBNIG et al., 2008; MURR et al., 2012). Assim, a deficiência de vitamina D pode atuar como um fator agravante na desregulação da inflamação e ativação do sistema imune, e pode ser visto como um fator de risco modificável responsável pelo aumento da inflamação (SCHLEITHOFF et al., 2006). Os mecanismos pelos quais os níveis séricos de 1,25(OH)₂D (em oposição aos níveis intracelulares) afetam as células do sistema imunológico ainda são desconhecidos; no entanto, baixa concentração plasmática de 1,25(OH)₂D foi correlacionada com baixas contagens de células T CD4⁺ e mortalidade em pacientes infectados com HIV-1, particularmente aqueles com doença avançada (HAUG et al., 1994).

1.2.2 Vitamina D e o Estresse Oxidativo

Além dos efeitos imunomoduladores da vitamina D, evidências sugerem um potencial efeito antioxidante deste hormônio. Baixos níveis de vitamina D foram associados ao aumento dos marcadores inflamatórios, do estresse oxidativo e nitrosativo (CHEN et al., 2014; LAN et al., 2014; SALES DE ALMEIDA et al., 2016; SHARIFI et al., 2014). Wiseman (1993), foi o primeiro a descrever o papel antioxidante da vitamina D, mostrando que a forma ativa deste hormônio foi capaz de inibir a peroxidação lipídica dependente de ferro. Outro estudo demonstrou que a vitamina D possui potente papel antioxidante na supressão da peroxidação lipídica dependente de zinco (LIN; CHEN; CHAO, 2005). Além disso, foi proposto pelos autores que a vitamina D possui um efeito antioxidante muito maior do que o efeito da vitamina E (LIN; CHEN; CHAO, 2005). Kuzmenko et al. (1997) demonstraram os efeitos da vitamina D sobre o estresse oxidativo e peroxidação lipídica pela suplementação

de vitamina D em modelo animal. Animais com deficiência de vitamina D tinham altos níveis de MDA, que diminuíram significativamente após a suplementação.

Evidências sugerem que a vitamina D possui efeito antioxidante devido a um aumento dos níveis de GSH hepática em ratos que receberam vitamina D (SARDAR; CHAKRABORTY; CHATTERJEE, 1996). Além disso, estudos do perfil de expressão genética relataram que a 1,25(OH)₂D e seus análogos induzem genes que controlam o equilíbrio *redox*, incluindo glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), enzima responsável pela redução do NADPH, GPx e tioredoxina redutase, está enzima é responsável pela redução de tioredoxina que possui ação antioxidante restaurando os grupos sulfidrila (SH) (LIN et al., 2002; PEEHL et al., 2004). Bao et al. (2008) demonstraram que a 1,25(OH)₂D pode proteger células não malignas da próstata de morte celular induzida por estresse oxidativo, pela ativação da transcrição de G6PD, fortalecendo o papel antioxidante da vitamina D na prevenção do câncer. Além disso, a ativação da CYP27B1 em macrófagos, resulta em um aumento de 1,25(OH)₂D, que reduz a expressão de iNOS e diminui a produção de NO mediada por LPS (CHANG et al., 2004)

Outros estudos demonstraram as propriedades antioxidantes da vitamina D em humanos. Tarcin et al. (2009) relataram que a administração de 300.000 UI de vitamina D₃ por três meses em pacientes com deficiência de vitamina D diminuiu significativamente os níveis séricos de MDA e observou-se uma correlação negativa entre os níveis de 25(OH)D e MDA. Em concordância com estes resultados, Sharifi et al. (2014) avaliaram o efeito da suplementação com 50.000 UI de vitamina D₃ por quatro meses em adultos com doença hepática não alcoólica e os resultados demonstraram que, após a suplementação, níveis séricos da PCR e MDA apresentaram uma redução significativa, indicando um possível efeito inibidor da peroxidação lipídica nestes pacientes.

A suplementação com vitamina D reduziu marcadores do estresse oxidativo e nitrosativo em diversas populações (CHEN et al., 2014; DE MEDEIROS CAVALCANTE et al., 2015; SHARIFI et al., 2014). Um estudo realizado no Brasil mostrou que, após suplementação com vitamina D durante quatro semanas, as mulheres apresentaram um aumento significativo da capacidade antioxidante total do plasma e uma diminuição de PCR e alfa-1 glicoproteína ácida (DE MEDEIROS CAVALCANTE et al., 2015).

Estas evidências indicam um possível papel antioxidante da vitamina D, bem como propriedades anti-inflamatórias em estudos realizados *in vivo*. No entanto, os

mecanismos pelos quais este hormônio atuaria como antioxidante ainda não estão bem elucidados. Sabe-se que um dos efeitos fisiológicos do VDR quando liga-se a forma ativa da 1,25(OH)₂D parece estar envolvido na diminuição da ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) e, desta maneira, exerceeria um papel anti-inflamatório e antioxidante intrínseco (CHEN et al., 2013).

1.3 VITAMINA D E INFECÇÃO PELO HIV-1

A hipovitaminose D é uma desordem mundial, com alta prevalência tanto na população em geral (HOLICK; CHEN, 2008; VAN SCHOOR; LIPS, 2011) quanto em pacientes infectados pelo HIV-1 (MANSUETO et al., 2015). No entanto, na infecção pelo HIV-1 há uma combinação dos fatores de riscos tradicionais para a deficiência de vitamina D (pouca exposição à luz solar, dieta pobre em vitamina D, idade e pele negra), com os fatores específicos do vírus e da terapia antirretroviral (LAKE; ADAMS, 2011).

A prevalência de deficiência de vitamina D relatada por regiões geográficas em adultos com HIV-1 foi de 19-100% nos Estados Unidos da América, 14-81% na Europa, 27-37% na Tailândia, 9,2% na Tanzânia, 88% no Irã, 45-86% na África do Sul, 73% na Índia e 83% no Nepal. Um estudo demonstrou que a prevalência de baixos níveis de 25(OH)D variou significativamente segundo o país de origem e etnia do indivíduo com HIV-1, assim como com a sazonalidade, sendo o valor médio de 49%, variando de 23% no Brasil, 27% no Haiti, 34% no Peru, 55% no Zimbabwe, 72% na Índia e 78% na Tailândia (HAVERS et al., 2014). Coletivamente, estes dados indicam que a deficiência de vitamina D em indivíduos que vivem com HIV-1/aids é frequente e amplamente variável; no entanto, não existem evidências conclusivas que a deficiência de vitamina D em adultos infectados pelo HIV-1 é mais prevalente que em adultos não infectados por este vírus (HAVERS et al., 2014).

Entre os indivíduos não infectados pelo HIV-1, várias comorbidades estão associadas com a deficiência de vitamina D. No entanto, estes resultados sobrepõem-se consideravelmente com doenças não relacionadas à aids, que recentemente tornaram-se mais prevalentes na população infectada pelo HIV-1. Por exemplo, baixa densidade mineral óssea é 4 a 6 vezes mais prevalente em pessoas infectadas pelo HIV-1 comparado a população em geral (BROWN; QAQISH, 2006). Além disso, pacientes infectados pelo HV-1,

principalmente aqueles em HAART, possuem um risco aumentado para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, doenças renais, diabetes mellitus, síndrome metabólica, dislipidemia e lipodistrofia (MORIMOTO et al., 2014; PALELLA et al., 2006).

Vários estudos demonstraram a associação entre baixos níveis de vitamina D e concentrações elevadas de alguns marcadores de inflamação, incluindo PCR e IL-6 em indivíduos infectados pelo HIV-1 (ANSEMANT et al., 2013; KULLER et al., 2008; LEGEAI et al., 2013; MISSAILIDIS et al., 2015; RODGER et al., 2009; SHEPHERD et al., 2014). Shepherd et al. (2014) mostraram que a deficiência grave de 25(OH)D (<10 ng/mL) estava associada com um aumento progressivo de IL-6 e PCR em pacientes infectados pelo HIV-1, sugerindo que a deficiência de vitamina D pode piorar o estado inflamatório em pessoas infectadas pelo HIV-1. Além disso, a hipovitaminose D em pacientes infectados pelo HIV-1 tem sido associada com progressão da doença, aumento de complicações e morte relacionada à infecção pelo HIV-1 (HAVERS et al., 2014; MEHTA et al., 2010; SHEPHERD et al., 2014; VIARD et al., 2011).

A tabela 1 sumariza alguns estudos sobre vitamina D realizados em pacientes infectados pelo HIV-1.

Tabela 1 – Prevalência de hipovitaminose D em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1)

Autor	País	Indivíduos	Resultados de 25(OH)D	Comentários
Dao et al., 2011.	EUA	672 HIV+ vs. HIV-	< 30 ng/mL = 70,3% HIV+ vs. 79,1% HIV-	Alta prevalência de hipovitaminose D em HIV+, porém menos prevalente que adultos da população norte americana HIV-.
Adeyemi et al., 2011.	EUA	Mulheres: 1268 HIV+ vs. 510 HIV-	< 20ng/mL em 60% HIV+ vs. 72% HIV-	Alta prevalência de deficiência de vitamina D em mulheres norte americanas HIV+ e HIV-.
Crutchley et al., 2012.	EUA	200 HIV+	< 20 ng/mL = 64% < 10 ng/mL = 20,5%	Raça negra, elevado IMC e baixa ingestão diária de vitamina D foram independentemente associados com hipovitaminose D.
Rodriguez et al., 2009.	EUA	57 HIV+	< 32 ng/mL = 74,4% < 20 ng/mL = 36,8% < 10 ng/mL = 10,5%	Hipovitaminose D é frequente em pacientes ambulatoriais HIV+ e foi associada com baixa ingestão de vitamina D.
Kim et al., 2012.	EUA	274 HIV+	< 10 ng/mL = 21,2% 10 – 29 ng/mL = 68,6% ≥ 30 ng/mL = 10,2%	Deficiência de vitamina D é altamente prevalente em pacientes HIV+. Carga viral detectável e raça negra foram associados com deficiência de vitamina D.
Arpardi et al., 2009.	EUA	56 HIV+	< 20 ng/mL = 45%	Hipovitaminose D associada com baixa exposição ao sol e baixa ingestão de vitamina D.
Viard et al., 2011.	Europeus, Israel e Argentina	31 países 1985 HIV+ EuroSIDA	< 10 ng/mL = 23,7% 10 – 30 ng/mL = 65,3% > 30 ng/mL = 11%	Os fatores de risco associados aos baixos níveis de 25(OH)D foram a idade avançada, raça negra, vivendo fora do Sul da Europa/Argentina e amostras coletadas durante o inverno.
Allavena et al., 2012.	França	2994 HIV+	< 30 ng/mL = 55,6% < 10 ng/mL = 32,4%	A deficiência de vitamina D foi associada com o uso do cigarro, dosagem fora do período do verão, contagens de células CD4 ⁺ <350/mm ³ e o uso da HAART, principalmente com efavirenz.
Van Den Bout-Van Den Beukel et al., 2008.	Holanda	252 HIV+	< 35 nmol/L de abril a setembro e < 25 nmol/L de outubro a março foi de 29%	A raça negra foi um fator de risco independente associado a grave deficiência de vitamina D.
Welz et al., 2010.	Reino Unido	1077 HIV+	< 30 ng/mL = 91% < 10 ng/dL = 34,8%	A grave deficiência de vitamina D foi associada com a raça negra, contagem de LT CD4 ⁺ < 200/µL, uso de tenofovir e efavirenz.

Tabela 1 – Continuação

Autor	País	Indivíduos	Resultados de 25(OH)D	Comentários
Mueller et al., 2010.	Suíça	211 HIV+ HAART- <i>naïve</i>	< 30 ng/mL na primavera = 42% < 30 ng/mL no outono = 14%	O status de vitamina D variou de acordo com a estação do ano, uso de drogas intravenosas e tempo avançado de diagnóstico do HIV.
Cervero et al., 2012.	Espanha	352 HIV+	< 30 ng/mL = 71,6% < 20 ng/dL = 44%	Elevado índice de massa corpórea, raça negra, baixa exposição ao sol, uso de efavirenz e pouca supressão da carga viral foram independentemente associados com hipovitaminose D.
Mehta et al., 2010.	Tanzânia	884 mulheres HIV+	< 32 ng/mL = 39%	Hipovitaminose D foi associado com progressão da doença, aumento da mortalidade e anemia.
Conrado, et al., 2011.	Brasil	214 mulheres HIV+ em HAART	< 30 ng/mL = 40,65%	Hipovitaminose D foi independentemente associada com o uso prolongado de HAART e hipercolesterolemia.
Coelho et al., 2015	Brasil	97 HIV+ em HAART	> 30 ng/mL = 35% < 30 ng/mL = 65%	Após 34 semanas de suplementação com vitamina D, os autores observaram uma associação positiva entre as alterações nos níveis de 25(OH)D e a contagem de células CD4 ⁺ .
Havers et al., 2014.	9 países	411 HIV+ PEARLS	< 32 ng/mL = 49%	Os baixos níveis de vitamina D variaram de 27% no Brasil a 78% na Tailândia. Níveis baixos de vitamina D foram associados com aumento no risco de progressão do HIV-1, morte e falha virológica após início da HAART.
Welz et al., 2010.	Reino Unido	1077 HIV+	< 30 ng/mL = 91% < 10 ng/dL = 34,8%	A grave deficiência de vitamina D foi associada com a raça negra, contagem de células CD4 ⁺ < 200/ μ L, uso de tenofovir e efavirenz.
Gedela et al., 2013	Inglaterra	253 HIV+ <i>naïve</i>	< 20 ng/mL = 58% < 10 ng/dL = 13 %	A deficiência de vitamina D não foi associada com a contagem de células CD4 ⁺ , carga viral e estágio clínico da infecção.

HIV-: Indivíduos não infectados pelo HIV-1; HIV+: pacientes infectados pelo HIV-

1.3.1 Vitamina D e Terapia Antirretroviral de Alta Potência

A interação de metabólitos de vitamina D com o citocromo P450 é fundamental para a contribuição potencial da HAART na deficiência de vitamina D em pacientes infectados pelo HIV-1 (BROWN; MCCOMSEY, 2010; COZZOLINO et al., 2003; WELZ et al., 2010). Os resultados relatados em estudos sobre a associação da vitamina D com o uso de ARV são conflitantes; no entanto, todos sugerem uma associação da hipovitaminose D com o uso de efavirenz e tenofovir (LAKE; ADAMS, 2011).

Diminuição nos níveis séricos de vitamina D tem sido observada em vários estudos clínicos após a iniciação da HAART contendo inibidores não análogos da transcriptase reversa (NNRTI) (BROWN; MCCOMSEY, 2010; CONESA-BOTELLA et al., 2010; MUELLER et al., 2010; VAN DEN BOUT-VAN DEN BEUKEL et al., 2008), principalmente associado ao uso de efavirenz (ALLAVENA et al., 2012; BROWN; MCCOMSEY, 2010; WELZ et al., 2010; WIBOONCHUTIKUL et al., 2012). Efavirenz reduz a expressão da CYP2R1, enzima envolvida na 25-hidroxilação da vitamina D, e induz a catabolização da vitamina D, pela indução da CYP24A1, que converte a 25(OH)D e a 1,25(OH)2D nos seus metabólitos inativos (BROWN; MCCOMSEY, 2010), diminuindo os níveis de vitamina D.

Estudos têm relacionado o uso de tenofovir, um inibidor análogo da transcriptase reversa (NRTI), com a deficiência de vitamina D causada pelo hiperparatireoidismo ligado ao tenofovir (CHILDS et al., 2010; ROSENVINGE et al., 2010). Childs et al. (2010) observaram que o aumento de PTH foi independentemente associado ao uso de tenofovir. O PTH aumenta o metabolismo da 25(OH)D para 1,25(OH)2D, o que agrava ainda mais a deficiência de vitamina D (HOLICK, 2007). Além disso, Mueller et al. (2010) associaram o uso de tenofovir com o aumento da 1 α -hidroxilação da 25(OH)D. Welz et al. (2010) demonstraram que a grave deficiência de vitamina D (< 10 ng/mL) estava associada ao uso de tenofovir na HAART.

Os inibidores de protease (PI) são inibidores potentes do citocromo P450 hepático humano *in vivo* (EAGLING; BACK; BARRY, 1997; VON MOLTKE et al., 1998). PI, especialmente ritonavir, inibe 1 α -hidroxilação da 25(OH)D pela inibição da CYP27B1 *in vitro* (COZZOLINO et al., 2003), podendo resultar em baixos níveis de 1,25(OH)₂D. PI também inibem a 25-hidroxilase e a CYP24A1 em menor intensidade que a CYP27B1 (COZZOLINO et al., 2003). O uso de PI foi associado com baixa densidade mineral óssea em vários estudos

(BRIOT et al., 2011; DAO et al., 2011; MALIZIA et al., 2007). No entanto, estudos não encontraram associação com o uso de PI e baixos níveis de vitamina D (DAO et al., 2011; MUELLER et al., 2010; VIARD et al., 2011; WELZ et al., 2010).

1.3.2 Vitamina D e Marcadores Imunológicos e Virológicos da Infecção pelo HIV-1

O papel da vitamina D nos marcadores de progressão da doença, como a contagem de células CD4⁺ e a carga viral, é conflitante, tanto em experimentos *in vitro* (BISWAS et al., 1998; LOCARDI et al., 1990; PAUZA et al., 1993) como em humanos (AZIZ et al., 2013; COELHO et al., 2015; KAKALIA et al., 2011; VAN DEN BOUT-VAN DEN BEUKEL et al., 2008).

Em relação ao efeito da vitamina D na carga viral do HIV-1, Rigby, Waugh e Graziano (1990) demonstraram *in vitro* que a 1,25(OH)₂D pode diminuir a expressão de CD4⁺ na membrana celular de monócitos humanos, podendo ser um mecanismo para controlar a entrada do vírus. Em um experimento com macrófagos derivados de monócitos, o pré-tratamento com 1,25(OH)₂D por 3 a 5 dias antes da infecção resultou em forte supressão da replicação viral (PAUZA et al., 1993). No entanto, células pró-monocíticas U937 que foram expostas a 1,25(OH)₂D antes da infecção apresentaram um aumento na replicação do HIV-1 (PAUZA et al., 1993). Um efeito adverso semelhante sobre células pró-monocíticas foi demonstrado em outros experimentos, ocorrendo um aumento da replicação viral (KITANO et al., 1990; LOCARDI et al., 1990; SKOLNIK et al., 1991). De acordo com Biswas et al. (1998), a vitamina D pode aumentar a replicação viral por aumentar a expressão de CXCR4 em células pró-monocíticas que são normalmente pouco eficientes para sustentar a infecção pelo HIV-1. Uma vez que a 1,25(OH)₂D estimula a maturação de monócitos para macrófagos, o seu efeito na expressão do HIV-1 pode estar parcialmente relacionado com o seu papel na diferenciação celular, e o fato de que os investigadores usaram células em diferentes fases da diferenciação poderia ser uma explicação parcial para a inconsistência de resultados (VILLAMOR, 2006).

Considerando o efeito da vitamina D na carga viral e na contagem de linfócitos T CD4⁺ em estudos com humanos, estudos transversais envolvendo adultos infectados com HIV-1 sugeriram pela primeira vez o potencial efeito benéfico da vitamina D na contagem de células T CD4⁺ (HAUG et al., 1994; TEICHMANN et al., 2003). Haug et al., (1994), em um estudo realizado na Noruega com adultos infectados pelo HIV-1, demonstraram que a

concentração de 1,25(OH)₂D foi positivamente correlacionada com a contagem de células T CD4⁺ e CD8⁺, enquanto que nenhuma relação foi encontrada com os níveis de 25(OH)D. Da mesma forma, estudos realizados na Alemanha demonstraram uma correlação positiva entre a contagem de células T CD4⁺ e 1,25(OH)₂D (TEICHMANN et al., 2000, 2003). No entanto, estudos realizados em outras populações, na Espanha (SERRANO et al., 1995) e na Itália (MADEDDU et al., 2004), não encontraram correlações entre os metabólitos da vitamina D e a contagem de células T CD4⁺.

De Luis et al (2002) encontraram uma correlação positiva entre a ingestão de vitamina D e linfócitos T CD4⁺, e a cada 1 µg de vitamina D na dieta foi associado com um aumento significativo de 34 células T CD4⁺. No entanto, em um estudo de 481 adultos tailandeses, a suplementação de duas vezes ao dia durante 48 semanas com uma mistura comercial de 18 vitaminas e minerais incluindo a vitamina D, alguns em doses até 20 vezes maiores do que a dose diária recomendada, não houve efeito significativo sobre a mortalidade geral, a contagem de células T CD4⁺ ou carga viral plasmática (JIAMTON et al., 2003).

Em estudos mais recentes, Aziz et al. (2013) não encontraram diferença significativa entre o status da vitamina D e a contagem de linfócitos T CD4⁺ e carga viral antes do início da HAART. No entanto, após o início da HAART, pacientes com vitamina D abaixo de < 30 ng/mL tiveram uma recuperação final de linfócitos T CD4⁺ diminuída (AZIZ et al., 2013; EZEAMAMA et al., 2015). Em outro estudo, grave deficiência de vitamina D (≤ 10 ng/mL) foi associada com baixa contagem de linfócitos T CD4⁺, mas não com a carga viral do HIV-1, e após suplementação de vitamina D não houve aumento na contagem de células T CD4⁺ (POOWUTTIKUL et al., 2014). Em um estudo com crianças infectadas pelo HIV-1 que tinham a função imunológica relativamente preservada, a suplementação de vitamina D, em doses de 800 a 1600 UI por dia, não conduziu a um aumento na contagem de células T CD4⁺ e não alterou a carga viral plasmática (KAKALIA et al., 2011).

2 JUSTIFICATIVA

Hipovitaminose D tem sido associada com progressão da infecção pelo HIV-1 e aumento da mortalidade associada à aids (HAVERS et al., 2014; MEHTA et al., 2010; SHEPHERD et al., 2014; SUDFELD et al., 2012; VESCINI et al., 2011; VIARD et al., 2011). No entanto, o papel da vitamina D no curso clínico da infecção e dos marcadores laboratoriais de progressão da doença, como a contagem de células T CD4⁺ e carga viral é conflitante. Enquanto estudos da suplementação de vitamina D em adultos, adolescentes e crianças infectadas pelo HIV-1 têm sido demonstrados seguros e positivamente associados com a contagem de células T CD4⁺ (AZIZ et al., 2013; COELHO et al., 2015; ROSS et al., 2011), outros estudos encontraram resultados contraditórios (ARPADI et al., 2009; BEARDEN et al., 2013; ECKARD et al., 2012; GIACOMET et al., 2013). Além disso, o papel antioxidante da vitamina D na modulação do estresse oxidativo na infecção pelo HIV-1 tem sido pouco explorado.

Os níveis de 25(OH)D podem ser afetados por fatores genéticos e ambientais, estado nutricional, comorbidades, bem como os fatores que afetam a exposição à luz UV e absorção da vitamina D, como a sazonalidade, latitude e pigmentação da pele (HOLICK; CHEN, 2008; VAN SCHOOR; LIPS, 2011). Estes fatores, muito provavelmente, diferem entre as populações mundiais previamente avaliadas e a brasileira, o que contraindica a generalização dos resultados previamente publicados para os indivíduos brasileiros infectados pelo HIV-1. Considerando que os efeitos benéficos da vitamina D nos marcadores da infecção por HIV-1 permanecem obscuros, novos estudos realizados com indivíduos em vários contextos geográficos são necessários para elucidar o verdadeiro papel da vitamina D na progressão da infecção pelo HIV-1.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a associação entre o status de vitamina D com os marcadores imunológicos, virológicos e de estresse oxidativo em pacientes infectados pelo HIV-1

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar os níveis séricos de 25(OH)D e o status de vitamina D em indivíduos não infectados e infectados pelo HIV-1;
- Avaliar os marcadores de estresse oxidativo em indivíduos não infectados e infectados pelo HIV-1;
- Verificar a associação entre o status vitamina D com os marcadores imunológicos, virológicos e de estresse oxidativo em pacientes infectados pelo HIV-1.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade de Londrina (UEL) (CAAE N°. 0206.0.268.000-09, Anexo A). Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice A).

4.2 DELINEAMENTO

Realizou-se um estudo descritivo transversal em dois grupos de indivíduos.

4.3 POPULAÇÃO E AMOSTRA

A população foi constituída de pacientes infectados pelo HIV-1 de ambos os sexos, maiores que 18 anos de idade, atendidos no Centro Integrado de Doenças Infecciosas DST/Aids da 17^a Regional de Saúde do Estado do Paraná, com sede em Londrina, e no Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário da UEL.

Foram inseridos 314 pacientes infectados pelo HIV-1 no período de julho de 2010 a março de 2011, sendo 95 (30,3%) não faziam uso de HAART e 219 (69,7%) estavam e uso de HAART há mais de 6 meses, que incluía NRTI, NNRTI e PI. O diagnóstico da infecção pelo HIV-1 foi realizado de acordo com a Portaria nº. 151 de 14 de outubro de 2009 do Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde (BRASIL, 2009). A amostra foi obtida de forma consecutiva, por conveniência de tempo e local. O grupo controle foi composto por 127 indivíduos não infectados pelo HIV-1 selecionados entre doadores de sangue do Hemocentro Regional de Londrina e população em geral da mesma área geográfica dos pacientes, controlados por idade, sexo, etnia e IMC.

Todos os pacientes não apresentavam coinfecção pelo vírus da hepatite C e B, desordens renais (creatinina sérica > 2,48 mg/dL), hepáticas (aspartato aminotransferase > 200 UI/L ou alanino aminotransferase > 225/UI) (VAN DEN BOUT-VAN DEN BEUKEL et al., 2008). Todos os indivíduos relataram que não ingeriam bebida alcóolica regularmente.

4.4 DADOS DEMOGRÁFICOS, EPIDEMIOLÓGICOS, ANTROPOMÉTRICOS E CLÍNICOS

As informações sobre os dados demográficos, fatores epidemiológicos (como estilo de vida, tabagismo, etilismo, atividade física) e história médica foram obtidas por meio de uma avaliação clínica e aplicação de um questionário (Apêndice B). A duração da doença e terapias utilizadas foram registradas para cada paciente. Os participantes relataram não estarem em uso de dieta específica, bem como o uso de suplementação com antioxidantes e vitamina D. O peso corporal foi medido com aproximação de 0,1 quilograma (kg) utilizando uma balança eletrônica, com os indivíduos vestindo roupas leves, sem sapatos e no período da manhã. A altura foi medida com uma aproximação de 0,1 centímetro (cm) por meio de um estadiômetro. O IMC foi calculado como peso (kg) dividido pela altura (m) ao quadrado.

4.5 COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO

Após jejum de 12 horas, os indivíduos (pacientes e controles) foram submetidos à coleta de sangue venoso sem e com EDTA como anticoagulante. O material foi centrifugado a 3.000 r.p.m. por 15 minutos e alíquotas do soro e plasma foram armazenadas no freezer a -80°C até o momento de uso.

4.6 DETERMINAÇÃO DE VITAMINA D

Os níveis de vitamina D foram avaliados pelos valores de 25(OH)D obtidos por imunoensaio em micropartículas por quimioluminescência (CMIA, Architect i2000[®], Abbott Laboratório), segundo as recomendações e valores de referência do fabricante. De acordo com os níveis séricos de 25(OH)D, os grupos de pacientes e controles foram classificados em dois status: vitamina D suficiente quando os valores eram ≥ 30ng/mL e vitamina D deficiente quando os valores eram < 30 ng/mL (HOLICK, 2007).

4.7 MARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO

4.7.1 Oxidantes

4.7.1.1 Peroxidação lipídica

A avaliação da formação de hidroperóxidos lipídicos por quimioluminescência foi efetuada em uma adaptação da técnica descrita anteriormente (GONZALEZ FLECHA; LLESUY;

BOVERIS, 1991). A quimioluminescência estimulada por t-butil hidroperóxido foi empregada para analisar a integridade dos mecanismos de defesa antioxidantes não enzimáticos e os níveis de lipoperóxidos presentes no plasma. O teste baseia-se na premissa de que um aumento de quimioluminescência está relacionado com um estresse oxidativo prévio sofrido pelo tecido, levando ao consumo das defesas antioxidantes de baixo peso molecular, tais como vitamina E, com formação de lipoperóxidos, resultando em um aumento da emissão de fôtons (GONZALEZ FLECHA; LLESUY; BOVERIS, 1991). Foi utilizado um contador β (Beckman[®] modelo LS 6000). As análises foram efetuadas em frascos de plástico para cintilação e protegidas da luz. Os resultados foram medidos em contagens por minuto (cpm).

4.7.1.2 Produtos avançados da oxidação proteica (AOPP)

Os níveis de AOPP foram determinados no plasma pelo método descrito previamente por Witko-Sarsat et al (1998). AOPP resultam da oxidação de resíduos de aminoácidos, tais como a tirosina, que conduzem à formação de produtos ditirosine detectados por espectrofotometria. As concentrações de AOPP foram expressas em $\mu\text{mol/L}$ de equivalentes de cloramina-T.

4.7.1.3 Determinação de proteínas carbonílicas

O conteúdo carbonílico de proteínas é amplamente utilizado como biomarcador de dano oxidativo em proteínas sob condições de estresse oxidativo (VASCONCELOS et al., 2007). O método utilizado para sua quantificação no plasma foi espectrofotométrico, baseado na reação da 2,4 dinitrofenilhidrazina com o grupo carbonila, formando a 2,4dinitrofenilhidrazona, de acordo com a técnica descrita por Reznick e Packer (1994). Os resultados foram expressos em $\text{nmol mL}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteínas totais.

4.7.1.4 Metabólitos do óxido nítrico (NOx)

Os níveis de NOx foram determinados no plasma por espectrofotometria de acordo com a reação de Griess, com algumas modificações, descrita previamente por Panis et al. (2012). Esta técnica utiliza o grânulo de cádmio para reduzir nitrato a nitrito, o qual é quantificado ao formar um complexo colorido com reagente de Griess. Os resultados foram expressos em μM .

4.7.2 Antioxidantes

4.7.2.1 Capacidade antioxidant total do plasma

Determinou-se a capacidade antioxidant total do plasma por meio do método do TRAP, como descrito previamente (REPETTO et al., 1996). Por este método quantificam-se antioxidantes hidro e lipossolúveis presentes no plasma, avaliados por quimioluminescência. O método baseia-se no princípio da adição de um gerador de radicais livres, 2,2-azobis (2-amidinopropano), que por sua vez, são neutralizados pelos antioxidantes presentes no plasma. O sistema foi calibrado com um análogo comercial da vitamina E (Trolox®). As análises foram realizadas em um equipamento leitor de quimioluminescência (Beckman® modelo LS 6000). Os valores de TRAP foram corrigidos pelos níveis séricos de ácido úrico (AU), segundo estudos prévios (VENTURINI et al., 2012) e os resultados foram expressos em μM Trolox/AU mg/dL. A determinação dos níveis séricos de AU foi realizada utilizando-se um autoanalizador bioquímico (Dimension® RxL Max, Sistema Integrado de Química), expressos em mg/dL, segundo as recomendações e valores de referência do fabricante.

4.7.2.2 Grupamento sulfidrila de proteínas

A quantificação de grupamentos sulfidrila (SH) de proteínas foi avaliado no plasma por espectrofotometria, de acordo com o método descrito por Hu (1994). Esta técnica baseia-se na reação do ácido 2,2 ditiobisnitrobenzóico (DTNB) com o grupo tiol das proteínas. Os resultados foram expressos em μM .

4.8 CONTAGEM DE LINFÓCITOS T CD4⁺ E CD8⁺

Amostras de sangue periférico foram coletadas com anticoagulante EDTA para a contagem de linfócitos T CD45⁺, T CD3⁺, T CD4⁺ e T CD8⁺ pelo método de citometria de fluxo (plataforma BD FACSCalibur® BD Bioscience, San Jose, CA, USA). Os resultados foram expressos em células/mm³, segundo as recomendações do fabricante. Para análise, os resultados foram categorizados em: $\geq 500/\text{mm}^3$, $<500 - \geq 200/\text{mm}^3$ e $<200/\text{mm}^3$.

4.9 DETERMINAÇÃO DA CARGA VIRAL PLASMÁTICA DE HIV-1

A quantificação do RNA do HIV-1 no plasma foi realizada por metodologia de DNA *branched* (bDNA), utilizando-se a plataforma Sistems 340[®] bDNA Analyser (Siemens Medical Solutions Diagnostics, Tarrytown, NY, USA), segundo as recomendações do fabricante. Os valores foram expressos como cópias/mL e log₁₀ RNA do HIV-1. Para análise, os resultados foram categorizados em: indetectável < 50 cópias/mL e detectável ≥ 50 cópias/mL.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises de contingência (teste χ^2) foram utilizadas para verificar as associações entre as variáveis categóricas e os grupos do estudo. Foram avaliadas as diferenças das variáveis contínuas utilizando análises de variância (ANOVA), seguidas pelo teste de Tukey para examinar as comparações múltiplas entre médias de grupos quando necessário. As variáveis categóricas foram expressas em número absoluto (n) e percentual (%) e as variáveis contínuas foram expressas como média ± erro padrão da média (SEM). Foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov para avaliar a normalidade de distribuição das variáveis. Transformações logarítmicas (Ln) de dados contínuos foram utilizadas nas análises quando as variáveis não apresentaram distribuição normal ou quando não havia heterogeneidade da variância (conforme avaliado com o teste de Levene). A associação entre os status de vitamina D em pacientes infectados pelo HIV-1 e os marcadores foi avaliada utilizando a regressão logística binária, controlados para covariáveis que podem confundir a associação de interesse. *Odds ratio* (OR) e intervalo de confiança (IC) de 95% foram calculados. Análises de regressão logística multinomial foram utilizadas para definir as variáveis significativas (OR e IC de 95%) do status de vitamina D em pacientes e controles utilizando as variáveis que se mostraram com valores de p <0,10. A análise estatística foi realizada com SPSS para Windows, versão 20.0 (SPSS Inc., CHIGADO, IL, EUA). A significância estatística foi definida como p <0,05.

5 RESULTADOS

5.1 ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados obtidos neste trabalho foram apresentados e discutidos em um artigo científico submetidos ao periódico *HIV Medicine*.

VITAMIN D STATUS IS ASSOCIATED WITH LIPID PEROXIDATION AND VIRAL LOAD IN HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1-INFECTED PATIENTS

Running head: HIV-1 INFECTION AND VITAMIN D STATUS

Tamires Flauzino¹, Andréa NC Simão², Elaine A Delicato², Helena K Morimoto², Sayonara R Oliveira¹, Daniela F Alfieri¹, Luiz Toshio Ueda³, Edna MV Reiche².

¹Postgraduate Program, Health Sciences Center, State University of Londrina;

²Department of Pathology, Clinical and Toxicological Analysis, Health Sciences Center, State University of Londrina;

³Integrated Center of Infectious Diseases of 17^a Secretariat of Health of Paraná, Londrina, Paraná State, Brazil.

Corresponding author: Edna Maria Vissoci Reiche, Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology, Health Sciences Center, Londrina State University, Av. Robert Koch, 60, CEP 86.038-440, Londrina, Paraná, Brazil. Phone/FAX number: + 55-43-3371-2619. e-mail: reiche@sercomtel.com.br

ABSTRACT

Objective: The aim of the study was to evaluate the association between vitamin D status and immunological, virological, and oxidative stress markers in patients with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection.

Methods: The study evaluated 314 HIV-1-infected and 127 HIV-1 non-infected individuals. Serum 25 hydroxyvitamin D [25(OH)D] ≥ 30 ng/mL were defined as vitamin D sufficient and <30 ng/mL as vitamin D deficient status. The oxidative stress were evaluated by plasma levels of lipid hydroperoxides, advanced oxidation protein products (AOPP), carbonyl protein, nitric oxide metabolites (NOx), total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP), and sulphydryl groups of proteins. Plasma HIV-1 viral load and CD4 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ T cell counts were quantified.

Results: The 25(OH)D levels and vitamin D status did not differ between HIV-1 patients and controls. Hydroperoxides and AOPP were higher ($p<0.0001$ and $p=0.002$, respectively) while TRAP, carbonyl protein, and NOx were lower in HIV-1 patients than controls ($p<0.0001$). Independently of ethnicity and HAART, HIV-1 patients with deficient status showed higher hydroperoxides than those with sufficient status ($p=0.012$) and controls ($p=0.022$). Antiretroviral therapy (HAART, NRTIs, and NNRTIs) were associated with deficient status of vitamin D ($p=0.001$, $p=0.001$, and $p<0.0001$, respectively) and higher HIV-1 viral load was associated with sufficient status ($p=0.001$).

Conclusions: The results showed that vitamin D deficient status was associated with increased lipid peroxidation while the sufficient status was associated with high levels of HIV-1 viral load. These results should be explored with large samples to better elucidate the role of vitamin D in the HIV-1 pathophysiology and disease progression.

Keywords: Human Immunodeficiency Virus Infection, Vitamin D Deficient, 25-Hydroxyvitamin D, Oxidative Stress, Viral Load

INTRODUCTION

Hypovitaminosis D is common in both the general and human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infected individuals (1). In HIV-1 infected patients, low vitamin D levels are likely a combination of traditional risk factors, such as age, lack of exposure to sun light, low vitamin D intake, and dark skin pigmentation (2), as well as HIV-1-specific pathogenesis, and highly active antiretroviral therapy (HAART) (3,4).

HIV-1 infection causes a chronic inflammation as shown by high plasma levels of pro and inflammatory cytokines, chemokines, and reactive oxygen species (5). The oxidative stress in HIV-1-infected patients has been implicated in disease progression with decrease CD4⁺ T cells lymphocytes and increase in HIV-1 replication (5), as well as in developing other secondary disorders, such as cardiovascular diseases, insulin resistance, and metabolic syndrome (6).

Besides the skeletal impacts of vitamin D on bone health and calcium homeostasis, this micronutrient has important antioxidants effects. Vitamin D is a membrane antioxidant and its metabolites can inhibit lipid peroxidation (7,8). Studies showed that vitamin D status, measured through plasma levels of 25(OH)D, was inversely associated with lipid and protein oxidative stress markers (9,10). Moreover, vitamin D has important immunoregulatory properties, since vitamin D receptors are present on macrophages, dendritic cells, and activated T and B cells (11). The vitamin D is involved in maintaining immune system homeostasis through enhancement of innate immune

responses, regulation of inflammatory cascade, direct impact on T cell activation, and its capacity to modify the phenotype and function of antigen-presenting cells (12).

Low vitamin D levels have been associated with HIV-1 disease progression, HIV-related complications, and mortality (13–15). However, the role of vitamin D in the HIV-1 infection clinical course and laboratory markers of disease progression, such as CD4⁺ T cell counts and HIV viral load are conflicting. While single trials with vitamin D supplementation in adults, adolescents, and children infected with HIV-1 demonstrated safety and positive association with CD4⁺ T cell counts (16,17), other studies showed contradictory results (18–20). Moreover, the antioxidant role of vitamin D in modulating the oxidative stress in HIV-1 infection has been less explored. To address this issue, the aim of the present study was to evaluate the association between vitamin D status, as well as with immunological, virological, and oxidative stress markers in patients with HIV-1 infection.

MATERIALS AND METHODS

Study subjects

A cross-sectional survey was carried out among 314 HIV-1-infected patients consecutively recruited from Integrated Center of Infectious Diseases of 17^a Secretariat of Health of Paraná, and from the Specialized Outpatient of University Hospital of Londrina University, Paraná State, Brazil. All the HIV-1 patients did not present hepatitis B and C virus infection, renal disorders (serum creatinine > 2.48 mg/dL), and hepatic disorders (aspartate aminotransferase > 200 or alanine aminotransferase >225 IU/L) (21); 95 (30.3%) were HAART naïve and 219 (69.7%) were on HAART more than six months, including nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs), nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs), and protease inhibitors (PIs). The control group was constituted by 127 non-infected HIV-1

individuals selected among healthy blood donors of the Regional Blood Bank of Londrina and general population from the same area of the patients. The patients and controls were age, sex, ethnicity, and body mass index (BMI) controlled.

For all subjects included in the study, demographic, anthropometric, lifestyle factors, and medical history data were obtained on admission of them. BMI was calculated as weight (kg) divided by height (m) squared. The ethnicity was self-reported as Caucasians and Non Caucasians (Black, Afro-Brazilian, and Asiatic). None of them reported the regular use of alcohol and a specific diet or antioxidant supplements, including vitamin D. The study received approval by the Institutional Research Ethics Committees of State University of Londrina (Paraná, Brazil) (CAAE n. 0206.0.268.000-09) and all individuals invited were informed in detail about the research and provided written informed consent.

Vitamin D measurements, immunological, and virological markers

Peripheral blood samples were collected during July 2010 to March 2011 period, with and without EDTA as anticoagulant, after fasting for 12 hours. When the assay was not performed in the same day, the samples were immediately centrifuged at 3.000 rpm for 15 minutes, and the plasma and sera aliquots were stored in the -80 °C until use. Vitamin D was evaluated through the 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] serum levels determined using chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA, Architect, Abbott Laboratory), and values ≥30 ng/mL were defined as vitamin D sufficient status and <30 ng/mL were vitamin D deficient status (22). The plasma HIV-1 RNA viral load was quantified using branched DNA (bDNA, Siemens System 340 platform, Siemens Medical Solutions Diagnostics) and the results were expressed as copies/mL, log₁₀, and detectable (≥ 50 copies/mL) or undetectable

(<50 copies/mL). The CD45⁺, CD3⁺, CD4⁺, and CD8⁺ T cell counts were determined in peripheral blood samples collected with EDTA using flow cytometry (BD FACSCalibur™ platform, BD Bioscience) and the results were expressed as cells/mm³, and categorized as ≥500/mm³, <500 - ≥200/mm³ and <200/mm³.

Oxidative stress markers

Lipid hydroperoxides were evaluated using tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence (CL-LOOH) in plasma, as described previously (23) and the results were expressed in counts per minute (cpm). Carbonyl protein content was measured as an estimate of protein oxidative injury, as described elsewhere (24) and the results were expressed in nmol/mL/mg total proteins. Advanced oxidation protein products (AOPP) were determined in plasma as result of the oxidation of amino acid residues, such as tyrosine, leading to the formation of dityrosine containing protein cross-linked products detected by spectrophotometry (25). AOPP concentrations were expressed as μmol/L of chloramine-T equivalents.

Plasma levels of nitric oxide (NO) were assessed by its metabolites nitrite (NO₂⁻) and nitrate (NO₃⁻) concentration according to the Griess reaction supplemented by the reduction of nitrate to nitrite with cadmium (26) and the results of nitric oxide metabolites (NOx) were expressed in μM. Total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP) was determined as reported previously (27). Briefly, this method detects hydrosoluble and/or liposoluble plasma antioxidants by measuring the chemiluminescence inhibition time induced by 2,2-azobis (2-amidinopropane). The system was calibrated with the vitamin E analog TROLOX. Serum levels of uric acid (UA) (mg/dL) were also evaluated using a biochemical auto-analyzer (Dimension Dade AR Dade Behring) to correct the TRAP values, as

reported (28) TRAP values were expressed in equivalent of μM Trolox/UA mg/dL. Sulfhydryl (SH) groups of proteins were evaluated in plasma samples by a spectrophotometric assay based on 2,2-dithiobisnitrobenzoic acid (DTNB), as reported previously (29), and the results were expressed in μM .

Statistical analyses

Analyses of contingency tables (χ^2 test) were employed to check the associations between categorical variables and diagnostic groups. We assessed the differences in continuous variables between groups using analyses of variance (ANOVAs) followed by the Tukey test to examine multiple comparisons among subgroup means, when appropriated. Categorical variables were expressed as absolute number (n) and percentage (%) and continuous variables were expressed as mean \pm standard error of mean (SEM). The Kolmogorov-Smirnov test was used to assess normality of distribution. Logarithmic (Ln) transformation of continuous data was used in the analyses when the variables were not normally distributed or when there was heterogeneity of variance (as assessed with the Levene test). Logistic regression binary analysis was used for adjustment of smoking between patients and controls. Multinomial logistic regression analyses was used to define the significant associations of vitamin D status in HIV-1-infected patients and controls using the biomarkers with $p<0.10$. Odds ratio (OR) and 95% confidence interval (95% CI) were also calculated. The association between vitamin D status in HIV-infected patients and the biomarkers was evaluated using binary logistic regression analysis with controlled for covariates that may confound the association of interest in different models (with OR and 95% CI). The statistical analysis was performed with SPSS for Windows, version 20.0 (SPSS Inc., Chigago, IL, USA) and significance was defined as $p<0.05$.

RESULTS

Baseline characteristics and oxidative stress results of the HIV-1-infected patients and controls included in this study are shown in Table 1. As expected, there was no significant difference in age, sex, ethnicity, and BMI between the study groups. The proportion of smoking individuals was significantly higher in patients than controls ($p<0.0001$). 25(OH)D levels and vitamin D status did not differ between HIV-1-infected patients and controls. All the serum makers of oxidative stress, except SH groups of proteins, differed between HIV-1 patients and controls, after p adjusted by smoking. Hydroperoxides and AOPP were higher ($p<0.0001$ and $p=0.002$, respectively) while TRAP, carbonyl protein, and NOx levels were lower ($p<0.0001$) in patients than controls.

The baseline characteristics and oxidative stress markers of HIV-1 infected patients, according to their vitamin D status, and controls with vitamin D sufficient status are shown in Table 2. There were no significant differences in age, sex, BMI, and smoking between these three subgroups. However, the proportion of Caucasian individuals was significantly higher in controls with vitamin D sufficient status than in HIV-1-infected patients with vitamin D deficient status ($p=0.025$). HIV-1 patients with vitamin D deficient status showed higher hydroperoxides than those with sufficient vitamin D status and controls ($p<0.0001$). Moreover, HIV-1 patients with vitamin D deficient as well sufficient status showed lower carbonyl protein and TRAP values than controls with vitamin D sufficient status ($p=0.007$ and $p=0.003$, respectively).

Explanatory variables that showed p values <0.10 in the Table 2, were further analyzed using a multinomial logistic regression analysis with the two subgroups of HIV-1-

infected patients according to their vitamin D status and controls with vitamin D sufficient status (Table 3). Independently of ethnicity of all the individuals, and the HAART use by the HIV-1 patients, the patients with vitamin D deficient status showed higher hydroperoxides than those with sufficient status ($p=0.012$) and controls ($p=0.022$). Carbonyl protein in HIV-1 infected patients with vitamin D deficient status was lower than controls ($p=0.039$), and did not differ between HIV-1 sufficient status. Moreover, patients with deficient and sufficient status showed lower NOx ($p<0.0001$) and TRAP ($p<0.0001$ and $p=0.001$, respectively) than controls, but these variables did not differ between the patients.

Clinical, virological, and immunological parameters of the HIV-1-infected patients according to their vitamin D status are presented in Table 4. $CD4^+/CD8^+$ T cell ratio was lower in patients with vitamin D sufficient status compared to those with vitamin D deficient status ($p=0.023$). Viral load, either expressed in copies/mL or \log_{10} copies/mL was significantly higher in patients with vitamin D sufficient status than those with vitamin D deficiency status ($p<0.0001$). Moreover, when the values of viral load were categorized as detectable and undetectable, the highest proportion of patients with vitamin D sufficient status presented detectable viral load 87 (64.0%), while among those with vitamin D deficient status the highest proportion of them presented undetectable viral load 118 (66.3%), $p<0.0001$ (Table 4 and Figure 1). Among the patients that were vitamin D deficient status the highest proportion of them were using HAART 138 (77.5%), while among those with vitamin D sufficient status, the highest proportion of them were HAART naïve 55 (40.4%), ($p=0.001$). As the same way, the frequency of patients that were using NRTI and NNRTI was higher among those with vitamin D deficient than those with vitamin D sufficient status ($P=0.001$ and $p<0.0001$, respectively). PI did not differ between vitamin D status in HIV-1-infected patients.

Table 5 shows the outcome of a binomial logistic regression analysis with the two subgroups of HIV-1-infected patients according to their vitamin D status as dependent variable and the significant results that were shown in Tables 4 as explanatory variables. The HIV-1 viral remained higher among those with vitamin D sufficient status, independently of CD4⁺/CD8⁺ T cell ratio, ethnicity, and HAART ($p=0.001$). When the antiretroviral of NRTI and NNRTI classes were added to the model of statistical analysis, the HIV-1 viral load remained significantly associated with vitamin D sufficient status.

DISCUSSION

The main findings of the present study are that HIV-1 patients with vitamin D deficient status presented higher levels of hydroperoxides compared with HIV-1-infected and HIV-1-uninfected individuals with sufficient vitamin D status; moreover, patients with vitamin D sufficient status present the higher HIV-1 viral load. These results may be supported through the pleiotropic properties of this hormone also in the immune response and in the redox-driven events in HIV-1-infected patients, besides the classic effects on the bone and calcium homeostasis.

In addition, the presented study did not find differences in the serum levels of 25(OH)D as well as in the frequency of hypovitaminosis D between the HIV-1-infected and HIV-1-uninfected individuals. Although hypovitaminosis D was highly prevalent in HIV-1-infected patients, these results are consistent with previous studies (18,30,31). However, Dao et al (2011) showed that vitamin D deficient status were highly prevalent among HIV-1-infected patients but were less prevalent among adults in the general North American population.

As would be expected, higher lipid hydroperoxides and AOPP, and lower total antioxidant capacity evaluated using TRAP were observed in HIV-1-infected individuals than controls, corroborating previous findings that demonstrated increased oxidative stress in HIV-1 infected patients (34,35). However, the lower carbonyl protein and NOx levels obtained in HIV-1 infected patients compared to controls were intriguing. HIV-1 stimulates *in vitro* NO production by human macrophages, according to the concentration of recombinant gp120 HIV-1 envelope glycoprotein (36). The excessive production of NO by inducible nitric oxide synthase (iNOS) may contribute to tissue damage in several inflammatory and infectious diseases, and to AIDS pathogenesis (37). However, the data of NO or its metabolite such as nitrite levels obtained in HIV-1 infected individuals are controversial (37,38). The lower NOx levels observed in the present study may be explained by the impairment of NO biodisponibility because NO is consumed in a reaction with superoxide anion yielding a strong oxidant molecule, the peroxynitrite (ONOO⁻), which in turn accelerates the lipid peroxidation (39,40).

Oxidative stress also increases the levels of protein oxidation that may be measured by the AOPP and protein carbonylation (25,41). In our study, the higher AOPP and lower carbonyl protein content presented by the HIV-1 patients than controls may be explained due the AOPP is an advanced oxidation protein product while carbonyl protein is early formed (41), suggesting that protein oxidation in the HIV-1 infection may reach the endpoint stages of this oxidative mechanism.

As the higher levels of lipid peroxidation marker were observed among the HIV-1 patients with vitamin D deficiency compared to those with vitamin D sufficient status, while the protein oxidation markers did not differ among these subgroups of patients, this result suggest that the antioxidant activity of vitamin D may be more significant against the lipid

peroxidation than protein oxidation. These results are consistent with previous study that showed the ability of vitamin D to inhibit iron-induced lipid peroxidation by stabilizing the membrane against lipid peroxidation via an interaction between its hydrophobic rings of the molecule structure (7). This author proposed that the hydrophobic parts of the 25(OH)D interfered with fatty acid residues that impair the viscosity of the cell membrane and thus protect the cell membrane from lipid peroxidation. Through its lipophilic property, 25(OH)D molecule may accumulate in membranes to achieve the concentrations found to inhibit lipid peroxidation. Our results are also consistent with those that demonstrated that vitamin D has potent antioxidant effect in suppressing zinc-induced lipid peroxidation (8).

Although our study did not find association between vitamin D status and total antioxidant capacity, when it was evaluated using TRAP, we should not exclude its role in the antioxidant defense in HIV-1 infection. However, this result suggests that other antioxidant molecules may exert more significant antioxidant activity in HIV-1-infected patients. The evaluation of different antioxidant molecules with other methods than TRAP in these patients could be useful to a better comprehension of the antioxidant systems that can modulate the redox imbalance associated with this viral infection.

The role of vitamin D in the HIV-1 clinical course and laboratory markers of disease progression, such as CD4⁺ T cell counts and viral load, is conflicting *in vitro* experiments (42–44). In human studies, while deficient vitamin D status has been associated with HIV-1 disease progression, HIV-related complications, and mortality (13–15,45), other studies did not confirm the influence of this micronutrient in the disease laboratory markers (18,19,46).

The present study, surprisingly, showed that vitamin D sufficient status was associated with higher viral load than those with deficient status of this hormone. Although

this result appears to be unexpected, corroborates the hypothesis that it could be as result of the activation of the innate immune response by vitamin D. One study (14) found that 25(OH)D at baseline has a non-statistically significant association with low viral load and the authors discussed that high 25(OH)D levels in the face of elevated viral loads prior to HAART initiation may result from increased systemic immune activation and modulation of vitamin D by activated macrophages; however, the authors suggested further investigation about this issue. In the same way, Bearden et al (2013) found no association between decreased viral load and increased 25(OH)D and there was no evidence for a nonlinear relationship. However, increasing 1,25-dihydroxyvitamin D [1,25(OH)₂D] levels were associated with higher viral load as well, creating an U-shaped association with a change point of 32 pg/mL, likely reflecting a complex role of vitamin D in HIV-1 infection (19). *In vitro* studies showed increased replication of HIV-1 in promonocytic cell lines in the presence of 1,25(OH)₂D, possibly related to the maturation effects of 1,25(OH)₂D on monocytes and to the influence of tumor necrosis factor (TNF)- α (43,44). However, these results were not consistent among studies and some of them suggest an antiviral role for vitamin D in HIV-1 infection (47,48).

In the present study, the frequency of patients that were using NRTI and NNRTI was higher among those with vitamin D deficient than those with sufficient status. This result also is consistent with previous evidence that HAART could modify vitamin D metabolism, either directly, through the inhibition or activation of hydroxylation enzymes, such as the PIs and the NNRTI efavirenz (49), or indirectly, through the impact on proximal tubular function, such as the NRTI tenofovir (50).

A limitation of observational studies such as the present one is that this design does not allow us to conclude on the direction or causality of the observed relationships. Moreover, 25(OH)D levels are affected by genetic variants, nutritional status, environment

factors, comorbidities, as well as factors that affect UV light exposure and absorption, such as seasonality, latitude, and skin pigmentation (51). These factors, very likely, differ between the population worldwide previously evaluated and between the Brazilian cohort of the present study.

Taken together, the study underscored the presence of hypovitaminosis D in the uninfected and HIV-1 infected individuals and that this status may be involved in the redox-driven events in HIV-1 patients, mainly in the lipid peroxidation. The results suggested that vitamin D may modulate, in part, the oxidative stress in these patients and may exhibit an independent and positive role in the viral load, possibly thought innate immune response activation. Moreover, the decreased serum levels of vitamin D in HIV-1- infected patients may contribute to the worsening of comorbidities that are associated with this chronic inflammatory disease as well as HAART use.

Considering that the beneficial effects of vitamin D in the markers of HIV-1 disease progression remain unclear, further studies conducted with large samples of individuals and in multiple geographic settings are warranted to elucidate the true role of vitamin D in the HIV-1 pathophysiology.

Acknowledgments

The study was supported by grants from Coordination for the Improvement of Higher Level of Education Personnel (CAPES) of Brazilian Ministry of Education; Institutional Program for Scientific Initiation Scholarship (PIBIC) of the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), and State University of Londrina (PROPPG). We thank the University Hospital of State University of Londrina for technical and administrative supports.

Conflict of Interest Statement

All the authors declare that there is no conflict of interest.

REFERENCES

1. van Schoor NM, Lips P. Worldwide vitamin D status. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2011; **25**: 671–80.
2. Lake JE, Adams JS. Vitamin D in HIV-Infected Patients. *Curr HIV/AIDS Rep* 2011; **8**(3): 133–41.
3. Brown TT, McComsey GA. Association between initiation of antiretroviral therapy with efavirenz and decreases in 25-hydroxyvitamin D. *Antivir Ther* 2010; **15**(3): 425–9.
4. Cozzolino M, Vidal M, Arcidiacono MV, Tebas P, Yarasheski KE, Dusso AS. HIV-protease inhibitors impair vitamin D bioactivation to 1,25-dihydroxyvitamin D. *AIDS* 2003; **17**(4): 513–20.
5. Stephensen CB, Marquis GS, Douglas SD, Wilson CM. Immune activation and oxidative damage in HIV-positive and HIV-negative adolescents. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005; **38**(2):180–90.
6. Simao ANC, Victorino VJ, Morimoto HK, Reiche EM V, Panis C. Redox-driven events in the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection and their clinical implications. *Curr HIV Res* 2015; **13**(2): 143–50.
7. Wiseman H. Vitamin D is a membrane antioxidant. Ability to inhibit iron-dependent lipid peroxidation in liposomes compared to cholesterol, ergosterol and tamoxifen and relevance to anticancer action. *FEBS Lett* 1993; **326** (1-3):285–8.
8. Lin AMY, Chen KB, Chao PL. Antioxidative effect of vitamin D₃ on zinc-induced oxidative stress in CNS. *Ann N Y Acad Sci* 2005; **1053**: 319–29.

9. Tarcin O, Yavuz DG, Ozben B, Telli A, Ogunc AV, Yuksel M, et al. Effect of vitamin D deficiency and replacement on endothelial function in asymptomatic subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; **94**(10): 4023–30.
10. Sales de Almeida JP, Liberatti LS, Nascimento Barros FE, Kallaur AP, Batisti Lozovoy MA, Scavuzzi BM, et al. Profile of oxidative stress markers is dependent on vitamin D levels in patients with chronic hepatitis C. *Nutrition* 2016; **32**(3):362–7.
11. Nieto G, Barber Y, Rubio MC, Rubio M, Fibla J. Association between AIDS disease progression rates and the Fok-I polymorphism of the VDR gene in a cohort of HIV-1 seropositive patients. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004; **89-90**: 199–207.
12. Lang P, Aspinall R. Can We Translate Vitamin D Immunomodulating Effect on Innate and Adaptive Immunity to Vaccine Response? *Nutrients* 2015; **7**(3): 2044–60.
13. Mehta S, Giovannucci E, Mugusi FM, Spiegelman D, Aboud S, Hertzmark E, et al. Vitamin D status of HIV-infected women and its association with HIV disease progression, anemia, and mortality. *PLoS One* 2010; **5**(1):e8770.
14. Havers F, Smeaton L, Gupte N, Detrick B, Bollinger RC, Hakim J, et al. 25-Hydroxyvitamin D insufficiency and deficiency is associated with HIV disease progression and virological failure post-antiretroviral therapy initiation in diverse multinational settings. *J Infect Dis* 2014; **210**(2):244–53.
15. Shepherd L, Souberbielle JC, Bastard JP, Fellahi S, Capeau J, Reekie J, et al. Prognostic value of vitamin D level for all-cause mortality, and association with inflammatory markers, in HIV-infected persons. *J Infect Dis* 2014; **210**(2):234–43.
16. Aziz M, Livak B, Burke-Miller J, French AL, Glesby MJ, Sharma A, et al. Vitamin D insufficiency may impair CD4 recovery among Women's Interagency HIV Study participants with advanced disease on HAART. *AIDS* 2013; **27**(4):573–8.
17. Coelho L, Cardoso SW, Luz PM, Hoffman RM, Mendonça L, Veloso VG, et al. Vitamin D₃ supplementation in HIV infection: effectiveness and associations with antiretroviral therapy. *Nutr J* 2015; **14**(1):81.

18. Eckard AR, Judd SE, Ziegler TR, Camacho-Gonzalez AF, Fitzpatrick AM, Hadley GR, et al. Risk factors for vitamin D deficiency and relationship with cardiac biomarkers, inflammation and immune restoration in HIV-infected youth. *Antivir Ther* 2012; **17**(6):1069–78.
19. Bearden A, Abad C, Gangnon R, Sosman JM, Binkley N, Safdar N. Cross-sectional study of vitamin D levels, immunologic and virologic outcomes in HIV-infected adults. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; **98**(4):1726–33.
20. Giacomet V, Vigano A, Manfredini V, Cerini C, Bedogni G, Mora S, et al. Cholecalciferol supplementation in HIV-infected youth with vitamin D insufficiency: effects on vitamin D status and T-cell phenotype: a randomized controlled trial. *HIV Clin Trials* 2013; **14**(2):51–60.
21. Van Den Bout-Van Den Beukel CJ, Fievez L, Michels M, Sweep FC, Hermus AR, Bosch ME, et al. Vitamin D deficiency among HIV type 1-infected individuals in the Netherlands: effects of antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2008; **24**(11):1375–82.
22. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007; **357**(3):266–81.
23. Gonzalez Flecha B, Llesuy S, Boveris A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *Free Radic Biol Med* 1991; **10**(2):93–100.
24. Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods in Enzymology* 1994. **233**:357-363
25. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen T, Capeillère-blandin C, Nguyen AT, Canteloup S, et al. Advanced Oxidation Protein Products as Novel Mediators of Inflammation and Monocyte Activation in Chronic Renal Failure. *J Immunol* 1998; **161**:2524–32.
26. Panis C, Herrera ACSA, Victorino VJ, Campos FC, Freitas LF, De Rossi T, et al. Oxidative stress and hematological profiles of advanced breast cancer patients subjected to paclitaxel or doxorubicin chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat* 2012; **133**(1):89–97.

27. Repetto M, Reides C, Gomez Carretero ML, Costa M, Griemberg G, Llesuy S. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. *Clin Chim Acta* 1996; **255**(2):107–17.
28. Venturini D, Simão ANC, Scribes NA, Bahls LD, Melo PAS, Belinetti FM, et al. Evaluation of oxidative stress in overweight subjects with or without metabolic syndrome. *Obesity* 2012; **20**(12):2361–6.
29. Hu ML. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods Enzymol* 1994; **233**:380–5.
30. Teichmann J, Stephan E, Discher T, Lange U, Federlin K, Stracke H, et al. Changes in calciotropic hormones and biochemical markers of bone metabolism in patients with human immunodeficiency virus infection. *Metabolism* 2000; **49**(9):1134–9.
31. Yin MT, Lu D, Cremers S, Tien PC, Cohen MH, Shi Q, et al. Short term bone loss in HIV infected premenopausal women. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2010; **53**(2):1–16.
32. Dao CN, Patel P, Overton ET, Rhame F, Pals SL, Johnson C, et al. Low vitamin D among HIV-infected adults: Prevalence of and risk factors for low vitamin D levels in a cohort of HIV-infected adults and comparison to prevalence among adults in the us general population. *Clin Infect Dis* 2011; **52**(3):396–405.
33. Israël N, Gougerot-Pocidalo MA. Oxidative stress in human immunodeficiency virus infection. *Cell Mol Life Sci* 1997; **53**(11-12):864–70.
34. Suresh DR, Annam V, Pratibha K, Prasad BVM. Total antioxidant capacity--a novel early bio-chemical marker of oxidative stress in HIV infected individuals. *J Biomed Sci* 2009; **16**(1):61.
35. Gil L, Martínez G, González I, Tarinas A, Alvarez A, Giuliani A, et al. Contribution to characterization of oxidative stress in HIV/AIDS patients. *Pharmacol Res* 2003; **47**(3):217–24.
36. Pietraforte D, Tritarelli E, Testa U, Minetti M. gp120 HIV envelope glycoprotein increases the production of nitric oxide in human monocyte-derived macrophages. *J Leukoc Biol* 1994; **55**:175–82.

37. Cairoli E, Scott-Algara D, Pritsch O, Dighiero G, Cayota A. HIV-1 induced decrease of nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression during in vivo and in vitro infection. *Clin Immunol* 2008; **127**(1):26–33.
38. Torre D, Pugliese A, Speranza F. Role of nitric oxide in HIV-1 infection: friend or foe? *Lancet Infect Dis* 2002; **2**(5):273–80.
39. Li R, Wang W, Zhang H, Yang X, Fan Q, Christopher TA, et al. Adiponectin improves endothelial function in hyperlipidemic rats by reducing oxidative/nitrative stress and differential regulation of eNOS/iNOS activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; **293**(6):E1703–8.
40. Tao L, Gao E, Jiao X, Yuan Y, Li S, Christopher TA, et al. Adiponectin cardioprotection after myocardial ischemia/reperfusion involves the reduction of oxidative/nitrative stress. *Circulation* 2007; **115**(11):1408–16.
41. Dalle Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 2003; **329**(1-2):23–38.
42. Pauza CD, Kornbluth R, Emau P, Richman DD, Deftos LJ. Vitamin D₃ compounds regulate human immunodeficiency virus type 1 replication in U937 monoblastoid cells and in monocyte-derived macrophages. *J Leukoc Biol* 1993; **53**(2):157–64.
43. Locardi C, Petrini C, Boccoli G, Testa U, Dieffenbach C, Buttò S, et al. Increased human immunodeficiency virus (HIV) expression in chronically infected U937 cells upon in vitro differentiation by hydroxyvitamin D₃: roles of interferon and tumor necrosis factor in regulation of HIV production. *J Virol* 1990; **64**(12):5874–82.
44. Biswas P, Mengozzi M, Mantelli B, Delfanti F, Brambilla A, Vicenzi E, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ upregulates functional CXCR4 human immunodeficiency virus type 1 coreceptors in U937 minus clones: NF-kappaB-independent enhancement of viral replication. *J Virol* 1998; **72**(10):8380–3.
45. Viard J, Souberbielle J, Kirk O, Reekie J, Knysz B, Losso M, et al. Vitamin D and clinical disease progression in HIV infection: results from the EuroSIDA study. *AIDS* 2011; **25**(10):1305–15.

46. Kakalia S, Sochett EB, Stephens D, Assor E, Read SE, Bitnun A. Vitamin D supplementation and CD4 count in children infected with human immunodeficiency virus. *J Pediatr* 2011; **159**(6):951–7.
47. Beard JA, Bearden A, Striker R. Vitamin D and the anti-viral state. *J Clin Virol* 2011; **50**(3):194–200.
48. Campbell GR, Spector S a. Hormonally active vitamin D₃ ($1\alpha,25$ -dihydroxycholecalciferol) triggers autophagy in human macrophages that inhibits HIV-1 infection. *J Biol Chem* 2011; **286**(21):18890–902.
49. Childs KE, Fishman SL, Constable C, Gutierrez JA, Wyatt CM, Dieterich DT, et al. Short communication: Inadequate vitamin D exacerbates parathyroid hormone elevations in tenofovir users. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2010; **26**(8):855–9.
50. Rosenvinge MM, Gedela K, Copas AJ, Wilkinson A, Sheehy CA, Bano G, et al. Tenofovir-Linked Hyperparathyroidism Is Independently Associated With the Presence of Vitamin D Deficiency. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2010; **54**(5):496–9.
51. Melamed ML, Michos ED, Post W, Astor B. 25-hydroxyl Vitamin D Levels and the Risk of Mortality in the General Population. *Arch Intern Med* 2008; **168**(15):1629–37.

Table 1: Baseline characteristics of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected patients and HIV-1 uninfected controls.

Characteristics	Controls n= 127	HIV-1-infected n=314	p-value
Age (years)	40 ± 1	40 ± 1	0.615
Sex n (%)			
Male	67 (52.8)	169 (53.8)	0.839
Female	60 (47.2)	145 (46.2)	
Ethnicity n (%)			
Caucasian	99 (78.0)	222 (70.7)	0.121
Non Caucasian	28 (22.0)	92 (29.3)	
Body mass index (kg/m ²)	25.52 ± 0.34	25.03 ± 0.23	0.254
Smoking n (%)			
Yes	18 (14.2)	102 (32.5)	<0.0001
No	109 (85.8)	212 (67.5)	
Vitamin D (ng/mL)	29.07 ± 0.81	29.94 ± 0.66	0.451
Vitamin D status n (%)			
Deficient (<30.0 ng/mL)	75 (59.1)	178 (56.7)	0.649
Sufficient (≥ 30 ng/mL)	52 (40.9)	136 (43.3)	
Hydroperoxides (cpm) ^{†*}	15537 ± 677	25022 ± 1107	<0.0001
AOPP (μmol/L of chloramine-T equivalents) ^{†*}	140.27 ± 4.59	165.80 ± 5.03	0.002
Carbonyl protein (nmol/mL/mg total proteins) ^{†*}	70.26 ± 2.32	53.63 ± 1.76	<0.0001
NOx (μM) ^{†*}	30.78 ± 2.33	19.90 ± 0.61	<0.0001
TRAP (μM Trolox/UA mg/dL) ^{†*}	162.30 ± 4.10	135.59 ± 2.27	<0.0001
Sulfhydryl groups of proteins (μM)*	0.35 ± 0.01	0.33 ± 0.01	0.094

χ² tests. Data are expressed in absolute number (%). ANOVA. Data are expressed in mean (±SEM). [†] These variables are processed in Ln transformation. *p adjusted by smoking. TRAP: Total radical-trapping antioxidant parameter; AOPP: Advanced oxidation protein product; NOx: Nitric oxide metabolites.

Table 2: Baseline characteristics and oxidative stress markers of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected patients according to their vitamin D status and controls

Variables	Controls with vitamin D sufficient (n= 52) ^A	HIV-1 infected with vitamin D sufficient (n=136) ^B	HIV-1 infected with vitamin D deficient (n= 178) ^C	p-value
Age (years)	39 ± 1	39 ± 1	40 ± 1	0.331
Sex n (%)				
Male	34 (65.4)	68 (50.0)	101 (56.7)	0.147
Female	18 (34.6)	68 (50.0)	77 (43.3)	
Ethnicity n (%)				
Caucasian	44 (84.6) ^C	103 (75.7)	119 (66.9) ^A	0.025
Non Caucasian	8 (15.4)	33 (24.3)	59 (33.1)	
Body mass index (kg/m ²) [†]	25.68 ± 0.64	24.75 ± 0.85	25.24 ± 0.31	0.361
Smoking n (%)				
Yes	11 (21.2)	48 (35.3)	54 (30.3)	0.168
No	41 (78.8)	88 (64.7)	124 (69.7)	
Hydroperoxides (cpm)	15449 ± 1171 ^{B,C}	20938 ± 1070 ^{A,C}	27517 ± 1632 ^{A,B}	<0.0001
AOPP (μmol/L of chloramine-T equivalents) [†]	143.76 ± 8.27	158.84 ± 6.34	171.33 ± 7.48	0.138
Carbonyl protein (nmol/mL/mg total proteins) [†]	68.45 ± 3.03 ^{B,C}	53.83 ± 2.72 ^A	53.47 ± 2.32 ^A	0.007
NOx (μM) [†]	29.85 ± 3.72	19.18 ± 2.72	20.47 ± 2.32	0.071
TRAP (μM Trolox/UA mg/dL) [†]	154.77 ± 5.52 ^{B,C}	134.48 ± 3.29 ^A	136.46 ± 3.12 ^A	0.003
Sulphydryl groups of proteins (μM)	0.35 ± 0.02	0.33 ± 0.01	0.32 ± 0.01	0.364

χ² tests. Data are expressed in absolute number (%). ANOVA and post test Tukey. Data are expressed in mean (±SEM).

[†] These variables are processed in Ln transformation. TRAP: total radical-trapping antioxidant parameter; AOPP: advanced oxidation protein product; NOx: Nitric oxide metabolites. A: Controls with 25-hydroxyvitamin D (25[OH]D) levels ≥ 30 ng/mL; B: HIV-1 infected patients with 25(OH)D levels ≥ 30 ng/mL; C: HIV-1 infected patients with 25(OH)D levels < 30 ng/mL

Table 3: Multinomial logistic regression analyses with controls with vitamin D sufficient status as the reference group and explanatory variables

Explanatory variables		<i>p</i> -value	Odds ratio	CI (95%)
Hydroperoxides	A vs B	0.128	1.000	1.000 – 1.000
	A vs C	0.022	1.000	1.000 – 1.000
	B vs C*	0.012	1.000	1.000 – 1.000
Carbonyl protein	A vs B	0.078	0.980	0.959 – 1.002
	A vs C	0.039	0.977	0.956 – 0.999
	B vs C*	0.487	1.003	0.994 – 1.012
NOx	A vs B	<0.0001	0.891	0.848 – 0.936
	A vs C	<0.0001	0.899	0.857 – 0.943
	B vs C*	0.493	0.991	0.965 – 1.017
TRAP	A vs B	0.001	0.979	0.967 – 0.991
	A vs C	<0.0001	0.978	0.966 – 0.990
	B vs C*	0.760	1.001	0.994 – 1.008
Ethnicity	A vs B	0.051	0.155	0.024 – 1.007
	A vs C	0.033	0.133	0.021 – 0.854
	B vs C*	0.618	1.151	0.661 – 2.004

CI: confidence interval; TRAP: total radical-trapping antioxidant parameter; NOx: Nitric oxide metabolites. A: Controls with 25-hydroxyvitamin D (25[OH]D) levels \geq 30 ng/mL; B: HIV-1 infected patients with 25(OH)D levels \geq 30 ng/mL; C: HIV-1 infected patients with 25(OH)D levels < 30 ng/mL.

*All the analysis between B versus C were done adjusting with the antiretroviral therapy status of the patients.

Table 4: Clinical, virological and immunological parameters in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected patients according to their vitamin D status

Variables	HIV-1 infected with vitamin D sufficient (n=136) ^B	HIV-1 infected with vitamin D deficient (n= 178) ^C	p-value
Age (years)	38.76 ± 9.94	40.37 ± 9.49	0.331
Sex n (%)			
Male	68 (50.0)	101 (56.7)	0.235
Female	68 (50.0)	77 (43.3)	
Ethnicity n (%)			
Caucasian	103 (75.7)	119 (66.9)	0.087
Non Caucasian	33 (24.3)	59 (33.1)	
Body mass index (kg/m ²)	24.75 ± 4.09	25.23 ± 4.14	0.361
CD4 ⁺ T cells/mm ³ [†]	471 ± 274	527 ± 296	0.113
CD4 ⁺ T cells n (%)			
≥500/mm ³	55 (40.4)	79 (44.4)	0.426
<500-≥200/mm ³	59 (43.4)	79 (44.4)	
<200/mm ³	22 (16.2)	20 (11.2)	
CD8 ⁺ T cells/mm ³ [†]	1093 ± 45.12	1024 ± 34.88	0.272
CD4 ⁺ /CD8 ⁺ ratio [†]	0.49 ± 0.03	0.58 ± 0.03	0.023
Viral load copies/mL [†]	22308 ± 6033	15982 ± 4796	<0.0001
Viral load (log ₁₀ copies/mL)	2.44 ± 0.17	1.30 ± 0.14	<0.0001
Viral load n (%)			
Undetectable	49 (36.0)	118 (66.3)	<0.0001
Detectable	87 (64.0)	60 (33.7)	
HAART n (%)			
Yes/No	81 (59.6)/55 (40.4)	138 (77.5)/40 (22.5)	0.001
NRTIs			
Yes/No	81 (59.6)/55 (40.4)	136 (76.4)/42 (23.6)	0.001
NNRTIs n (%)			
Yes/No	14 (10.3)/122 (89.7)	56 (31.5)/122 (68.5)	<0.0001
Protease inhibitors n (%)			
Yes/No	69(50.7)/67 (49.3)	83 (46.6)/95 (53.4)	0.471

^{χ2} tests. Data are expressed in absolute number (%). ANOVA. Data are expressed in mean (±SEM). [†]These variables are processed in Ln transformation. HAART: highly active antiretroviral therapy; NRTIs: nucleoside reverse transcriptase inhibitors; NNRTIs: non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. B: HIV-1 infected patients with 25-hydroxyvitamin D levels ≥ 30 ng/mL; C: HIV-1 infected patients with 25-hydroxyvitamin D levels < 30 ng/mL.

Table 5: Binomial logistic regression analysis with the two subgroups of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected patients according to their vitamin D status (sufficient and deficient)

Parameters	<i>p</i> -value	Odds ratio	CI (95%)
CD4 ⁺ /CD8 ⁺ ratio	0.218	1.602	0.757 – 3.389
Viral load (copies/mL)	0.053	1.000	1.000 – 1.000
Viral load (\log_{10} copies/mL)	0.001	0.742	0.619 – 0.888
Ethnicity	0.116	0.654	0.385 – 1.111
HAART*	0.734	1.132	0.554 – 2.315

CI: confidence interval; HAART: highly active antiretroviral therapy. * When the antiretroviral of NRTI and NNRTI classes were added to the model of statistical analysis, *p* values did not change.

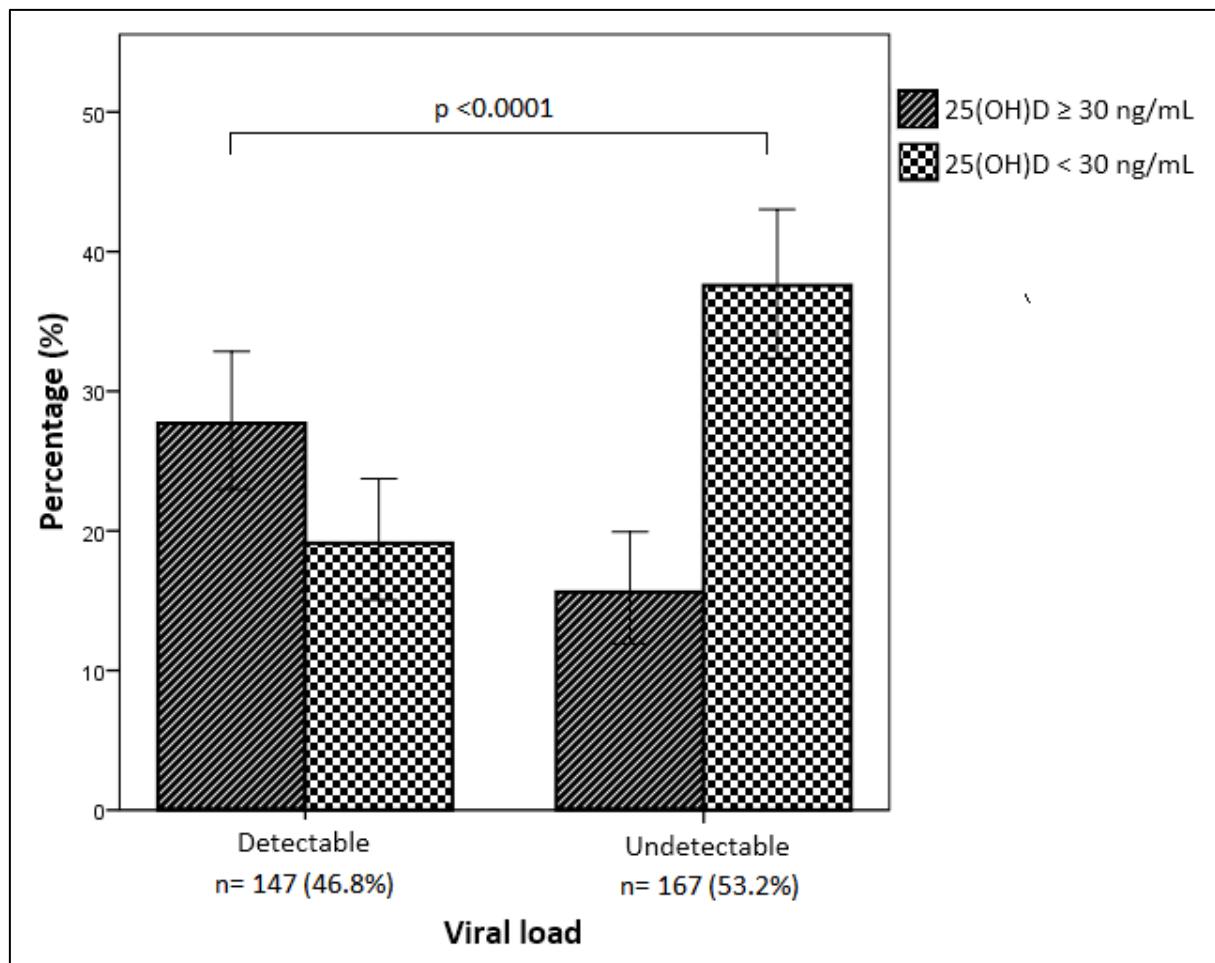


Figure 1: Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) viral load according to the vitamin D status of the patients, evaluated using 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] serum levels. The viral load was expressed as detectable (≥ 50 copies/mL) and undetectable (< 50 copies/mL)

6 CONCLUSÕES

O presente estudo possibilitou as seguintes conclusões:

- Não houve diferença nos níveis de 25(OH)D e no status de vitamina D entre os indivíduos infectados pelo HIV-1 e o grupo controle;
- Pacientes infectados pelo HIV-1 apresentaram maiores níveis de hidroperóxidos e AOPP, e baixos níveis de TRAP, proteína carbonílica e NO que os indivíduos controle;
- Pacientes infectados pelo HIV-1 com status de deficiência de vitamina D apresentaram níveis elevados de hidroperóxidos quando comparado aos pacientes e controles com níveis suficientes de vitamina D;
- A maior proporção pacientes que utilizavam HAART, NNRTI e NRTI estava no grupo com status deficiente de vitamina D;
- Pacientes infectados pelo HIV-1 com status suficiente de vitamina D apresentaram níveis elevados de carga viral comparados aos pacientes com status de deficiência de vitamina D, independente da etnia, uso de HAART em geral e uso de NNRTI e NRTI.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estresse oxidativo em pacientes infectados pelo HIV-1 está relacionado com a progressão da infecção para aids, assim como no desenvolvimento de doenças secundárias. Na busca de moléculas que apresentam ação antioxidant, a vitamina D apresentou importante associação com o marcador de peroxidação lipídica, sugerindo um possível papel antioxidant na infecção pelo HIV-1. No entanto, a associação da vitamina D com marcadores da progressão da infecção pelo HIV-1, como contagem de células T CD4⁺ e quantificação da carga viral, ainda não está claramente elucidada; como também ainda não há consenso sobre o benefício da suplementação com vitamina D na restauração da resposta imune e na inibição da replicação viral nestes pacientes. O estado da arte sobre a vitamina D e suas propriedades imunomoduladoras justifica a continuidade de estudos para a avaliação do real papel da vitamina D na fisiopatologia da infecção pelo HIV-1, bem como na modificação e prevenção dos fatores de risco associados com a deficiência de vitamina D nos indivíduos que vivem com o HIV/aids.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, J. S.; HEWISON, M. Unexpected actions of vitamin D: new perspectives on the regulation of innate and adaptive immunity. **Nature clinical practice Endocrinology & metabolism**, v. 4, n. 2, p. 80–90, 2008.
- ADEYEMI, O. M. et al. Vitamin D deficiency in HIV-infected and HIV-uninfected women in the United States. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 57, n. 3, p. 197–204, 2011.
- AGRAWAL, L. et al. Dopaminergic neurotoxicity of HIV-1 gp120: reactive oxygen species as signaling intermediates. **Brain research**, v. 1306, p. 116–30, 8 jan. 2010.
- ALLAVENA, C. et al. High frequency of vitamin D deficiency in HIV-infected patients: Effects of HIV-related factors and antiretroviral drugs. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 9, p. 2222–2230, 2012.
- ALROY, I.; TOWERS, T. L.; FREEDMAN, L. P. Transcriptional repression of the interleukin-2 gene by vitamin D₃: direct inhibition of NFATp/AP-1 complex formation by a nuclear hormone receptor. **Molecular and cellular biology**, v. 15, n. 10, p. 5789–99, out. 1995.
- ANSEMANT, T. et al. Severe hypovitaminosis D correlates with increased inflammatory markers in HIV infected patients. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, p. 7, 2013.
- ARPADI, S. M. et al. Effect of bimonthly supplementation with oral cholecalciferol on serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in HIV-infected children and adolescents. **Pediatrics**, v. 123, n. 1, p. e121–6, 2009.
- AZIZ, M. et al. Vitamin D insufficiency may impair CD4 recovery among Women's Interagency HIV Study participants with advanced disease on HAART. **AIDS (London, England)**, v. 27, n. 4, p. 573–8, 2013.
- BAO, B.-Y. et al. Protective role of 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D₃ against oxidative stress in nonmalignant human prostate epithelial cells. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 122, n. 12, p. 2699–706, 2008.
- BEARDEN, A. et al. Cross-sectional study of vitamin D levels, immunologic and virologic outcomes in HIV-infected adults. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 98, n. 4, p. 1726–33, 2013.
- BECKMAN, J. S.; KOPPENOL, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. **The American journal of physiology**, v. 271, n. 5 Pt 1, p. C1424–37, nov. 1996.
- BIRBEN, E. et al. Oxidative stress and antioxidant defense. **The World Allergy Organization journal**, v. 5, n. 1, p. 9–19, 2012.
- BISWAS, P. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ upregulates functional CXCR4 human immunodeficiency virus type 1 coreceptors in U937 minus clones: NF-kappaB-independent enhancement of viral replication. **Journal of virology**, v. 72, n. 10, p. 8380–8383, 1998.
- BOULWARE, D. R. et al. Higher Levels of CRP, D-dimer, IL-6, and Hyaluronic Acid Before Initiation of Antiretroviral Therapy (ART) Are Associated With Increased Risk of AIDS or Death. **Journal of Infectious Diseases**, v. 203, n. 11, p. 1637–1646, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Portaria No. 151, de 2009. **Fluxograma Mínimo para o Diagnóstico Laboratorial da Infecção pelo HIV em indivíduos com idade acima de 18 (dezoito) meses**, Brasília, Distrito Federal. 2009.

BREEN, E. C. Pro- and anti-inflammatory cytokines in human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome. **Pharmacology & therapeutics**, v. 95, n. 3, p. 295–304, set. 2002.

BRIOT, K. et al. Prospective one-year bone loss in treatment-naïve HIV+ men and women on single or multiple drug HIV therapies. **Bone**, v. 48, n. 5, p. 1133–9, 1 maio 2011.

BROWN, T. T.; MCCOMSEY, G. A. Association between initiation of antiretroviral therapy with efavirenz and decreases in 25-hydroxyvitamin D. **Antiviral therapy**, v. 15, n. 3, p. 425–9, jan. 2010.

BROWN TT, QAQISH RB. Antiretroviral therapy and the prevalence of osteopenia and osteoporosis: a meta-analytic review. **AIDS**, v. 20, n. 17, p: 2165–74, 2006.

CAIROLI, E. et al. HIV-1 induced decrease of nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression during in vivo and in vitro infection. **Clinical immunology (Orlando, Fla.)**, v. 127, n. 1, p. 26–33, abr. 2008.

CERRATO, E. et al. Cardiovascular disease in HIV patients: from bench to bedside and backwards. **Open heart**, v. 2, n. 1, p. e000174, 2015.

CERVERO, M. et al. Prevalence of Vitamin D Deficiency and Its Related Risk Factor in a Spanish Cohort of Adult HIV-Infected Patients: Effects of Antiretroviral Therapy. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 28, n. 9, p. 963–971, 2012.

CHANG, J.-M. et al. 1-alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 regulates inducible nitric oxide synthase messenger RNA expression and nitric oxide release in macrophage-like RAW 264.7 cells. **The Journal of laboratory and clinical medicine**, v. 143, n. 1, p. 14–22, jan. 2004.

CHEN, N. et al. Effect of Vitamin D Supplementation on the Level of Circulating High-Sensitivity C-Reactive Protein: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. **Nutrients**, v. 6, n. 6, p. 2206–2216, 10 jun. 2014.

CHEN, S. et al. Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on human B cell differentiation. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 179, n. 3, p. 1634–47, ago. 2007.

CHEN, Y. et al. Vitamin D Receptor Inhibits Nuclear Factor κB Activation by Interacting with IκB Kinase β Protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 27, p. 19450–19458, 5 jul. 2013.

CHESNEY, R. W. Vitamin D and The Magic Mountain: the anti-infectious role of the vitamin. **The Journal of pediatrics**, v. 156, n. 5, p. 698–703, 2010.

CHILDS, K. E. et al. Short communication: Inadequate vitamin D exacerbates parathyroid hormone elevations in tenofovir users. **AIDS research and human retroviruses**, v. 26, n. 8, p. 855–9, 2010.

CHIU, K. C. et al. Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and beta cell dysfunction. **The American journal of clinical nutrition**, v. 79, n. 5, p. 820–5, maio 2004.

- CIPPITELLI, M.; SANTONI, A. Vitamin D3: a transcriptional modulator of the interferon-gamma gene. **European journal of immunology**, v. 28, n. 10, p. 3017–30, out. 1998.
- CIRCU, M. L.; AW, T. Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems and apoptosis. **Free radical biology & medicine**, v. 48, n. 6, p. 749–762, 2010.
- COELHO, L. et al. Vitamin D3 supplementation in HIV infection: effectiveness and associations with antiretroviral therapy. **Nutrition Journal**, v. 14, n. 1, p. 81, 2015.
- COHEN, M. S. et al. Acute HIV-1 Infection. **The New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 20, p. 1943–1954, 2011.
- CONESA-BOTELLA, A. et al. Decrease of vitamin D concentration in patients with HIV infection on a non nucleoside reverse transcriptase inhibitor-containing regimen. **AIDS Res Ther**, v. 7, n. 1, p. 40, 2010.
- CONRADO, T. et al. Vitamin D Deficiency in HIV-Infected Women on Antiretroviral Therapy Living in the Tropics. **Journal of the International Association of Physicians in AIDS Care**, v. 10, n. 4, p. 239–45, 2011.
- COZZOLINO, M. et al. HIV-protease inhibitors impair vitamin D bioactivation to 1,25-dihydroxyvitamin D. **AIDS**, v. 17, n. 4, p. 513–520, 2003.
- CRUTCHLEY, R. et al. Risk factors for vitamin D deficiency in HIV-1 infected adults in the South-Central United States. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 28, p. 454-459, 2012.
- DALLE-DONNE, I. Biomarkers of Oxidative Damage in Human Disease. **Clinical Chemistry**, v. 52, n. 4, p. 601–623, 2006.
- DANIEL, C. et al. Immune Modulatory Treatment of Trinitrobenzene Sulfonic Acid Colitis with Calcitriol Is Associated with a Change of a T Helper (Th) 1/Th17 to a Th2 and Regulatory T Cell Profile. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 324, n. 1, p. 23–33, out. 2007.
- DAO, C. N. et al. Low vitamin D among HIV-infected adults: Prevalence of and risk factors for low vitamin D levels in a cohort of HIV-infected adults and comparison to prevalence among adults in the us general population. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n. 3, p. 396–405, 2011.
- DE LUIS, D. A. et al. Relation among micronutrient intakes with CD4 count in HIV infected patients [In Spanish]. **Nutrición hospitalaria**, v. 17, n. 6, p. 285–9, jan. 2002.
- DE MEDEIROS CAVALCANTE, I. G. et al. Effect of vitamin D3 supplementation and influence of BsmI polymorphism of the VDR gene of the inflammatory profile and oxidative stress in elderly women with vitamin D insufficiency: Vitamin D3 megadose reduces inflammatory markers. **Experimental gerontology**, v. 66, p. 10–6, jun. 2015.
- DELUCA, H. F. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. **The American journal of clinical nutrition**, v. 80, n. 6 Suppl, p. 1689–1696, 2004.
- DOBNIG, H. et al. Independent Association of Low Serum. **Arch Intern Med**, v. 168, n. 12, p. 1340–1349, 2008.

- DUSSO, A. S. et al. Vitamin D. **American Journal of Physiology Renal Physiology**, v. 289, p. 8–28, 2005.
- EAGLING, V. A; BACK, D. J.; BARRY, M. G. Differential inhibition of cytochrome P450 isoforms by the protease inhibitors, ritonavir, saquinavir and indinavir. **British journal of clinical pharmacology**, v. 44, n. 2, p. 190–194, 1997.
- ECKARD, A. R. et al. Risk factors for vitamin D deficiency and relationship with cardiac biomarkers, inflammation and immune restoration in HIV-infected youth. **Antiviral therapy**, v. 17, n. 6, p. 1069–78, 2012.
- ESTRADA, V. et al. Lipodystrophy and metabolic syndrome in HIV-infected patients treated with antiretroviral therapy. **Metabolism**, v. 55, n. 7, p. 940–945, 7 jul. 2006.
- EZEAMAMA, A. E. et al. Vitamin-D deficiency impairs CD4+T-cell count recovery rate in HIV-positive adults on highly active antiretroviral therapy: A longitudinal study. **Clinical Nutrition**, p. 1–8, 2015.
- FÉVRIER, M.; DORGHAM, K.; REBOLLO, A. CD4+ T cell depletion in human immunodeficiency virus (HIV) infection: role of apoptosis. **Viruses**, v. 3, n. 5, p. 586–612, 2011.
- FORMAN, J. P. et al. Plasma 25-hydroxyvitamin D levels and risk of incident hypertension. **Hypertension**, v. 49, p. 1063–1069, 2007.
- GEDELA, K. et al. Prevalence of vitamin D deficiency in HIV-positive, antiretroviral treatment-naïve patients in a single centre study. **International Journal of STD & AIDS**, v. 25, n. 7, p. 488–492, 18 dez. 2013.
- GIACOMET, V. et al. Cholecalciferol supplementation in HIV-infected youth with vitamin D insufficiency: effects on vitamin D status and T-cell phenotype: a randomized controlled trial. **HIV clinical trials**, v. 14, n. 2, p. 51–60, 2013.
- GIL, L. et al. Contribution to characterization of oxidative stress in HIV/AIDS patients. **Pharmacological research**, v. 47, n. 3, p. 217–24, mar. 2003.
- GIL, L. et al. Altered oxidative stress indexes related to disease progression marker in human immunodeficiency virus infected patients with antiretroviral therapy. **Biomedicine & Aging Pathology**, v. 1, n. 1, p. 8–15, jan. 2011.
- GINDE, A. A.; LIU, M. C.; CAMARGO JR, C. A. Demographic Differences and Trends of Vitamin D Insufficiency in the US Population, 1988-2004. **Arch Intern Med**, v. 169, n. 6, p. 626–632, 2009.
- GIOVANNUCCI, E. The epidemiology of vitamin D and cancer incidence and mortality: A review (United States). **Cancer Causes and Control**, v. 16, n. 2, p. 83–95, 2005.
- GONZALEZ FLECHA, B.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. **Free radical biology & medicine**, v. 10, n. 2, p. 93–100, jan. 1991.
- GUEVARA, I. et al. Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 274, n. 2, p. 177–88, 22 jun. 1998.

- HAUG, C. et al. Subnormal serum concentration of 1,25-vitamin D in human immunodeficiency virus infection: correlation with degree of immune deficiency and survival. **The Journal of infectious diseases**, v. 169, n. 4, p. 889–93, abr. 1994.
- HAVERS, F. et al. 25-Hydroxyvitamin D insufficiency and deficiency is associated with HIV disease progression and virological failure post-antiretroviral therapy initiation in diverse multinational settings. **The Journal of infectious diseases**, v. 210, n. 2, p. 244–253, 2014.
- HEWISON, M. An update on vitamin D and human immunity. **Clinical endocrinology**, v. 76, n. 3, p. 315–25, mar. 2012.
- HOLICK, M. F. The cutaneous photosynthesis of previtamin D₃: a unique photoendocrine system. **The Journal of investigative dermatology**, v. 77, n. 1, p. 51–8, jul. 1981.
- HOLICK, M. F. High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. **Mayo Clinic proceedings**, v. 81, n. 3, p. 353–73, 2006.
- HOLICK, M. F. Vitamin D deficiency. **N Engl J Med**, v. 357, n. 3, p. 266–281, 2007.
- HOLICK, M. F.; CHEN, T. C. Vitamin D defciency: a worldwide problem with health consequences. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 87, p. 1080S–6S, 2008.
- HU, M. L. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. **Methods in enzymology**, v. 233, p. 380–5, jan. 1994.
- HYPPÖNEN, E. et al. 25-Hydroxyvitamin D and pre-clinical alterations in inflammatory and hemostatic markers: a cross sectional analysis in the 1958 British Birth Cohort. **PloS One**, v. 5, n. 5, p. e10801, 2010.
- JIAMTON, S. et al. A randomized trial of the impact of multiple micronutrient supplementation on mortality among HIV-infected individuals living in Bangkok. **AIDS**, v. 17, n. 17, p. 2461–9, 2003.
- JIANG, B. et al. HIV-1 antiretrovirals induce oxidant injury and increase intima–media thickness in an atherogenic mouse model. **Toxicology Letters**, v. 187, n. 3, p. 164–171, 22 jun. 2009.
- KAKALIA, S. et al. Vitamin D supplementation and CD4 count in children infected with human immunodeficiency virus. **The Journal of pediatrics**, v. 159, n. 6, p. 951–7, 2011.
- KIM, J. H. et al. Evaluation of Vitamin D Levels Among HIV-Infected Patients in New York City. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 28, n. 3, p. 235–241, 2012.
- KITANO, K. et al. Differentiating agents facilitate infection of myeloid leukemia cell lines by monocytotropic HIV-1 strains. **Blood**, v. 76, n. 10, p. 1980–8, 15 nov. 1990.
- KLINER, E. R.; SUTLIFF, R. L. The roles of HIV-1 proteins and antiretroviral drug therapy in HIV-1-associated endothelial dysfunction. **Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research**, v. 56, n. 5, p. 752–69, jun. 2008.
- KONGSBAK, M. et al. Vitamin D-binding protein controls Tcell responses to vitamin D. **BMC Immunol** v. 15, p. 35, 2014.

- KULLER, L. H. et al. Inflammatory and coagulation biomarkers and mortality in patients with HIV infection. **PLoS medicine**, v. 5, n. 10, p. e203, 2008.
- KUZMENKO, A. I. et al. Effects of vitamin D₃ and ecdysterone on free-radical lipid peroxidation. **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 62, n. 6, p. 609–12, jun. 1997.
- LAKE, J. E.; ADAMS, J. S. Vitamin D in HIV-Infected Patients. **Current HIV/AIDS reports**, v. 8, n. 3, p. 133–41, 2011.
- LAN, N. et al. 25-hydroxyvitamin D₃-deficiency enhances oxidative stress and corticosteroid resistance in severe asthma exacerbation. **PLoS one**, v. 9, n. 11, p. e111599, 2014.
- LEE, J. H. et al. Vitamin D deficiency an important, common, and easily treatable cardiovascular risk factor? **Journal of the American College of Cardiology**, v. 52, n. 24, p. 1949–56, dez. 2008.
- LEGEAI, C. et al. Associations between 25-hydroxyvitamin D and immunologic, metabolic, inflammatory markers in treatment-naïve HIV-infected persons: the ANRS CO9 <<COPIANA>> cohort study. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e74868, 2013.
- LEMIRE, J. M. et al. 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ suppresses proliferation and immunoglobulin production by normal human peripheral blood mononuclear cells. **Journal of Clinical Investigation**, v. 74, n. 2, p. 657–661, ago. 1984.
- LI, R. et al. Adiponectin improves endothelial function in hyperlipidemic rats by reducing oxidative/nitrative stress and differential regulation of eNOS/iNOS activity. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 293, n. 6, p. E1703–E1708, 2007.
- LI, Y. C. Vitamin D regulation of the renin-angiotensin system. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 88, n. 2, p. 327–331, 1 fev. 2003.
- LIN, A. M. Y.; CHEN, K. B.; CHAO, P. L. Antioxidative effect of vitamin D₃ on zinc-induced oxidative stress in CNS. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1053, p. 319–29, ago. 2005.
- LIN, R. et al. Expression profiling in squamous carcinoma cells reveals pleiotropic effects of vitamin D₃ analog EB1089 signaling on cell proliferation, differentiation, and immune system regulation. **Molecular endocrinology**, v. 16, n. 6, p. 1243–56, jun. 2002.
- LIPS, P. Vitamin D physiology. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 92, n. 1, p. 4–8, set. 2006.
- LIU, K. et al. HIV-1 Tat protein-induced VCAM-1 expression in human pulmonary artery endothelial cells and its signaling. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, v. 289, n. 2, p. L252–60, ago. 2005.
- LIU, P. T. et al. Toll-Like Receptor Triggering of a Vitamin D-Mediate Human Antimicrobial Response. **Science**, v. 311, n. March, p. 1770–1773, 2006.
- LOCARDI, C. et al. Increased human immunodeficiency virus (HIV) expression in chronically infected U937 cells upon in vitro differentiation by hydroxyvitamin D₃: roles of interferon and tumor necrosis factor in regulation of HIV production. **Journal of virology**, v. 64, n. 12, p. 5874–82, 1990.

- LOOKER, A. C. et al. Serum 25-hydroxyvitamin D status of the US population: 1988-1994 compared with 2000-2004. **The American journal of clinical nutrition**, v. 88, n. 6, p. 1519–27, 2008.
- MADEDDU, G. et al. Bone mass loss and vitamin D metabolism impairment in HIV patients receiving highly active antiretroviral therapy. **The quarterly journal of nuclear medicine and molecular imaging**, v. 48, n. 1, p. 39–48, mar. 2004.
- MALIZIA, A. P. et al. HIV protease inhibitors selectively induce gene expression alterations associated with reduced calcium deposition in primary human osteoblasts. **AIDS research and human retroviruses**, v. 23, n. 2, p. 243–50, 1 fev. 2007.
- MANGIN, M.; SINHA, R.; FINCHER, K. Inflammation and vitamin D: the infection connection. **Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]**, v. 63, n. 10, p. 803–19, out. 2014.
- MANNICK, J. B. The antiviral role of nitric oxide. **Research in immunology**, v. 146, n. 9, p. 693–7, jan. 1995.
- MANSUETO, P. et al. Vitamin D Deficiency in HIV Infection: Not Only a Bone Disorder. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–18, 2015.
- MARTINEAU, A. R. et al. Reciprocal seasonal variation in vitamin D status and tuberculosis notifications in Cape Town, South Africa. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 47, p. 19013–7, 2011a.
- MARTINEAU, A. R. et al. High-dose vitamin D 3 during intensive phase treatment of pulmonary tuberculosis : a double-blind randomised controlled trial. **Lancet**, v. 377, n. 9761, p. 242–250, 2011b.
- MARTINS, D. Prevalence of Cardiovascular Risk Factors and the Serum Levels of 25-Hydroxyvitamin D in the United States. **Arch Intern Med**, v. 167, p. 1159–1165, 2007.
- MASIÁ, M. et al. Influence of antiretroviral therapy on oxidative stress and cardiovascular risk: a prospective cross-sectional study in HIV-infected patients. **Clinical therapeutics**, v. 29, n. 7, p. 1448–55, jul. 2007.
- MEHTA, S. et al. Vitamin D status of HIV-infected women and its association with HIV disease progression, anemia, and mortality. **PLoS One**, v. 5, n. 1, p. e8770, 2010.
- MELAMED, M. L. et al. 25-hydroxyl Vitamin D Levels and the Risk of Mortality in the General Population. **Arch Intern Med**, v. 168, n. 15, p. 1629–1637, 2008.
- MISSAILIDIS, C. et al. Vitamin D status in Well-Controlled Caucasian HIV Patients in Relation to Inflammatory and Metabolic Markers - A Cross-Sectional Cohort Study in Sweden. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 82, n. 1, p. 55–62, 2015.
- MORIMOTO, H. K. et al. Role of metabolic syndrome and antiretroviral therapy in adiponectin levels and oxidative stress in HIV-1 infected patients. **Nutrition**, v. 30, p. 1324–1330, 2014.
- MUELLER, N. J. et al. High prevalence of severe vitamin D deficiency in combined antiretroviral therapy-naïve and successfully treated Swiss HIV patients. **AIDS**, v. 24, n. 8, p. 1127–1134, 2010.

- MURR, C. et al. Vitamin D deficiency parallels inflammation and immune activation, the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health (LURIC) study. **Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC**, v. 50, n. 12, p. 2205–12, dez. 2012.
- NAGPAL, S.; NA, S.; RATHNACHALAM, R. Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. **Endocrine Reviews**, v. 26, n. 5, p. 662–687, 2005.
- NATHAN, C. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? **J Clin Invest**, v. 100, n. 10, p. 2417–2423, 1997.
- NGONDI, J. L. et al. The effect of different combination therapies on oxidative stress markers in HIV infected patients in Cameroon. **AIDS research and therapy**, v. 3, n. 19, 2006.
- NHANES, 2014. National Center for Health Statistics, Centers for Disease Control and Prevention, National health and nutrition examination survey, 2014. Disponível em: <http://www.cdc.gov/nchs/nhanes/about_nhanes.htm>.
- OGUNRO, P. S. et al. Total antioxidant status and lipid peroxidation in HIV-1 infected patients in a rural area of south western Nigeria. **African journal of medicine and medical sciences**, v. 34, n. 3, p. 221–5, set. 2005.
- OKOYE, A. A.; PICKER, L. J. CD4+ T-cell depletion in HIV infection: mechanisms of immunological failure. **Immunological reviews**, v. 254, n. 1, p. 54–64, 2013.
- PALELLA, F. J. et al. Mortality in the highly active antiretroviral therapy era: changing causes of death and disease in the HIV outpatient study. **Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)**, v. 43, n. 1, p. 27–34, set. 2006.
- PANIS, C. et al. Oxidative stress and hematological profiles of advanced breast cancer patients subjected to paclitaxel or doxorubicin chemotherapy. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 133, n. 1, p. 89–97, 2012.
- PASUPATHI, P. et al. Enhanced Oxidative Stress Markers and Antioxidant Imbalance in HIV Infection and AIDS Patients. **Journal of Scientific Research**, v. 1, n. 2, p. 370–380, 2009.
- PAUZA, C. D. et al. Vitamin D₃ compounds regulate human immunodeficiency virus type 1 replication in U937 monoblastoid cells and in monocyte-derived macrophages. **Journal of leukocyte biology**, v. 53, n. 2, p. 157–164, 1993.
- PEEHL, D. M. et al. Molecular activity of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in primary cultures of human prostatic epithelial cells revealed by cDNA microarray analysis. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 92, n. 3, p. 131–41, out. 2004.
- PENNA, G. et al. Expression of the inhibitory receptor ILT3 on dendritic cells is dispensable for induction of CD4+ Foxp3+ regulatory T cells by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. **Blood**, v. 106, n. 10, p. 3490–3497, 2005.
- PIETRAFORTE, D. et al. gp120 HIV envelope glycoprotein increases the production of nitric oxide in human monocyte-derived macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 55, n. February, p. 175–182, 1994.
- POOWUTTIKUL, P. et al. Vitamin D Insufficiency/Deficiency in HIV-Infected Inner City Youth. **Journal of the International Association of Providers of AIDS Care**, v. 13, n. 5, p. 438–42, jan. 2014.

- RADI, R. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 12, p. 4003–8, 2004.
- REICHE, E. M. V.; MORIMOTO, H. K.; DE ALMEIDA, E. R. D.; OLIVEIRA, S. R.; KALLAUR, A. P.; SIMÃO, A. N. C. Oxidative stress and human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection. In: Dichi, I.; Breganó, J. W.; SIMÃO, A. N. C.; CECCHINI, R. (eds). **Role of oxidative stress in chronic diseases**. CRC Press, 2014, p. 46 - 89.
- REPETTO, M. et al. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. **Clinica Chimica Acta**, v. 255, n. 2, p. 107–17, 1996.
- RESHI, M. L.; SU, Y.-C.; HONG, J.-R. RNA Viruses: ROS-Mediated Cell Death. **International Journal of Cell Biology**, v. 2014, p. 1–16, 2014.
- REZNICK, A. Z.; PACKER, L. **Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay**. [s.l.] Elsevier, 1994. v. 233
- RIGBY, W. F.; WAUGH, M.; GRAZIANO, R. F. Regulation of human monocyte HLA-DR and CD4 antigen expression, and antigen presentation by 1,25-dihydroxyvitamin D3. **Blood**, v. 76, n. 1, p. 189–97, 1 jul. 1990.
- RODGER, A. J. et al. Activation and coagulation biomarkers are independent predictors of the development of opportunistic disease in patients with HIV infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 200, n. 6, p. 973–983, 2009.
- RODRIGUEZ, M. et al. High frequency of vitamin D deficiency in ambulatory HIV-positive patients. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 25, p. 9–14, 2009.
- ROSEN, C. J. Vitamin D insufficiency. **The New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 3, p. 248–54, 2011.
- ROSENVINGE, M. M. et al. Tenofovir-Linked Hyperparathyroidism Is Independently Associated With the Presence of Vitamin D Deficiency. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 54, n. 5, p. 496–499, 2010.
- ROSS, A. C. et al. Vitamin D is linked to carotid intima-media thickness and immune reconstitution in HIV-positive individual. **Antiviral Therapy**, v. 16, n. 4, p. 555–563, 2011.
- ROSTKOWSKA-NADOLSKA, B. et al. Vitamin D derivatives: calcitriol and tacalcitol inhibits interleukin-6 and interleukin-8 expression in human nasal polyp fibroblast cultures. **Advances in medical sciences**, v. 55, n. 1, p. 86–92, jan. 2010.
- SARDAR, S.; CHAKRABORTY, A.; CHATTERJEE, M. Comparative effectiveness of vitamin D3 and dietary vitamin E on peroxidation of lipids and enzymes of the hepatic antioxidant system in Sprague–Dawley rats. **International journal for vitamin and nutrition research**, v. 66, n. 1, p. 39–45, jan. 1996.
- SALES DE ALMEIDA, J. P. et al. Profile of oxidative stress markers is dependent on vitamin D levels in patients with chronic hepatitis C. **Nutrition**, v. 32, n. 3, p. 362–7, 2016.
- SCHLEITHOFF, S. S. et al. Vitamin D supplementation improves cytokine profiles in patients with congestive heart failure: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 83, n. 4, p. 754–759, 2006.

- SERRANO, S. et al. Bone remodelling in human immunodeficiency virus-1-infected patients. A histomorphometric study. **Bone**, v. 16, n. 2, p. 185–91, fev. 1995.
- SHARIFI, N. et al. Does vitamin D improve liver enzymes, oxidative stress, and inflammatory biomarkers in adults with non-alcoholic fatty liver disease? A randomized clinical trial. **Endocrine**, v. 47, n. 1, p. 70–80, set. 2014.
- SHEPHERD, L. et al. Prognostic value of vitamin D level for all-cause mortality, and association with inflammatory markers, in HIV-infected persons. **Journal of Infectious Diseases**, v. 210, n. 2, p. 234–243, 2014.
- SKOLNIK, P. R. et al. Enhancement of human immunodeficiency virus 1 replication in monocytes by 1,25-dihydroxycholecalciferol. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 15, p. 6632–6636, 1991.
- STEPHENSEN, C. B. et al. Immune activation and oxidative damage in HIV-positive and HIV-negative adolescents. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 38, n. 2, p. 180–90, 2005.
- SUDFELD, C. R. et al. Vitamin D and HIV progression among Tanzanian adults initiating antiretroviral therapy. **PloS one**, v. 7, n. 6, p. e40036, 2012.
- SURESH, D. R. et al. Total antioxidant capacity--a novel early bio-chemical marker of oxidative stress in HIV infected individuals. **Journal of biomedical science**, v. 16, n. 1, p. 61, 2009.
- TAO, L. et al. Adiponectin cardioprotection after myocardial ischemia/reperfusion involves the reduction of oxidative/nitrative stress. **Circulation**, v. 115, n. 11, p. 1408–16, 2007.
- TARCIN, O. et al. Effect of vitamin D deficiency and replacement on endothelial function in asymptomatic subjects. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 94, n. 10, p. 4023–4030, 2009.
- TEICHMANN, J. et al. Changes in calcitropic hormones and biochemical markers of bone metabolism in patients with human immunodeficiency virus infection. **Metabolism: clinical and experimental**, v. 49, n. 9, p. 1134–9, 2000.
- TEICHMANN, J. et al. Osteopenia in HIV-infected women prior to highly active antiretroviral therapy. **The Journal of infection**, v. 46, n. 4, p. 221–227, 2003.
- TORRE, D.; PUGLIESE, A.; SPERANZA, F. Role of nitric oxide in HIV-1 infection: friend or foe? **The Lancet. Infectious diseases**, v. 2, n. 5, p. 273–80, maio 2002.
- VAN DEN BOUT-VAN DEN BEUKEL, C. J. et al. Vitamin D deficiency among HIV type 1-infected individuals in the Netherlands: effects of antiretroviral therapy. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 24, n. 11, p. 1375–1382, 2008.
- VAN SCHOOR, N. M.; LIPS, P. Worldwide vitamin D status. **Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism**, v. 25, p. 671–680, 2011.
- VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, p. 1323–1338, 2007.

- VASSIMON, H. S. et al. The association of lipodystrophy and oxidative stress biomarkers in HIV-infected men. **Current HIV research**, v. 8, n. 5, p. 364–9, jul. 2010.
- VENTURINI, D. et al. Evaluation of oxidative stress in overweight subjects with or without metabolic syndrome. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, v. 20, n. 12, p. 2361–6, dez. 2012.
- VESCINI, F. et al. Prevalence of hypovitaminosis D and factors associated with vitamin D deficiency and morbidity among HIV-infected patients enrolled in a large Italian cohort. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 58, n. 2, p. 163–172, 2011.
- VIARD, J. et al. Vitamin D and clinical disease progression in HIV infection: results from the EuroSIDA study. **AIDS (London, England)**, v. 25, n. 10, p. 1305–1315, 2011.
- VILLAMOR, E. A potential role for vitamin D on HIV infection? **Nutrition Reviews**, v. 64, n. 5, p. 226–233, 2006.
- VISALLI, V. et al. N-acetylcysteine prevents HIV gp 120-related damage of human cultured astrocytes: correlation with glutamine synthase dysfunction. **BMC neuroscience**, v. 8, n. 1, p. 106, 6 jan. 2007.
- VON MOLTKE, L. L. et al. Protease inhibitors as inhibitors of human cytochromes P450: high risk associated with ritonavir. **Journal of clinical pharmacology**, v. 38, n. 2, p. 106–11, fev. 1998.
- WEJSE, C. et al. Vitamin D as Supplementary Treatment for Tuberculosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 179, n. 9, p. 843–850, 2009.
- WELZ, T. et al. Efavirenz is associated with severe vitamin D deficiency and increased alkaline phosphatase. **AIDS**, v. 24, n. 12, p. 1923–1928, 2010.
- WHITE, J. H. Vitamin D metabolism and signaling in the immune system. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 13, n. 1, p. 21–29, mar. 2012.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO case definitions of HIV for surveillance and revised clinical staging and immunological classification of HIV-related disease in adults and children**, France: WHO Press, 2007, 50p.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Fact sheet 2015**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs360/en/>>. Acesso em: 08 Janeiro 2016.
- WIBOONCHUTIKUL, S. et al. Vitamin D insufficiency and deficiency among HIV-1-infected patients in a tropical setting. **Journal of the International Association of Physicians in AIDS Care (Chicago, Ill. : 2002)**, v. 11, n. 5, p. 305–10, jan. 2012.
- WISEMAN, H. Vitamin D is a membrane antioxidant. Ability to inhibit iron-dependent lipid peroxidation in liposomes compared to cholesterol, ergosterol and tamoxifen and relevance to anticancer action. **FEBS letters**, v. 326, n. 1-3, p. 285–8, 12 jul. 1993.
- WITKO-SARSAT, V. et al. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 161, n. 5, p. 2524–32, set. 1998.

XUE, M.-L. et al. 1 alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits pro-inflammatory cytokine and chemokine expression in human corneal epithelial cells colonized with *Pseudomonas aeruginosa*. **Immunology and cell biology**, v. 80, n. 4, p. 340–5, ago. 2002.

YAMAGUCHI, Y. et al. Elevated circulating levels of markers of oxidative-nitrative stress and inflammation in a genetic rat model of metabolic syndrome. **Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society**, v. 15, n. 4, p. 380–6, dez. 2006.

YU, Q. et al. Inducible nitric oxide synthase is involved in the oxidation stress induced by HIV-1 gp120 in human retina pigment epithelial cells. **Chinese medical journal**, v. 121, n. 24, p. 2578–83, 20 dez. 2008.

ZHANG, Y. et al. Vitamin D inhibits monocyte/macrophage proinflammatory cytokine production by targeting MAPK phosphatase-1. **Journal of Immunology**, v. 188, n. 5, p. 2127–35, 2012.

ZITTERMANN, A. Vitamin D and disease prevention with special reference to cardiovascular disease. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 92, n. 1, p. 39–48, set. 2006.

ANEXOS

ANEXO A

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

Universidade Estadual de Londrina/ Hospital Universitário Regional Norte do Paraná
Registro CONEP 268

Parecer PF Nº. 264/09
CAAE Nº. 0206.0.268.000-09
FOLHA DE ROSTO Nº. 306199

Londrina, 20 de abril de 2010.

PESQUISADORA: **EDNA MARIA VISSOCI REICHE**
CCS/PAC

Prezada Senhora:

O “Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina/ Hospital Universitário Regional Norte do Paraná” (Registro CONEP 268)—de acordo com as orientações da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto:

“AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES METABÓLICAS DO ESTRESSE OXIDATIVO E DO POLIMORFISMO GENÉTICO DO RECEPTOR DE LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE (LDLR) EM PACIENTES INFECTADOS PELOS VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA TIPO 1 (HIV-1), ATENDIDOS EM LONDRINA E REGIÃO, PARANÁ”

Situação do Projeto: **APROVADO**

Informamos que deverá ser comunicada, por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da pesquisa, bem como deverá apresentar ao CEP/UEL relatório final da pesquisa.

Atenciosamente,

Profª. Dra. Alexandrina Aparecida Maciel

Coordenadora
Comitê de Ética em Pesquisa-CEP/UEL

APÊNDICES

APÊNDICE A
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Por favor, leia cuidadosamente este consentimento e não hesite em perguntar sobre qualquer dúvida que tenha.

Você está sendo convidado (a) a participar, voluntariamente, de um projeto de pesquisa com o título “Avaliação das alterações metabólicas, do estresse oxidativo e do polimorfismo genético do receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDLR) em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1), atendidos em Londrina e região, Paraná”, coordenado pela professora Dra. Edna Maria Vissoci Reiche e com a participação de outros docentes pesquisadores da Universidade Estadual de Londrina. Cabe ao senhor (a) decidir se pretende participar ou não. Caso não tenha condições de ler e/ou compreender as informações contidas neste termo, o mesmo poderá ser assinado e datado por um membro da sua família ou responsável legal.

Você está tendo a opção de participar de uma pesquisa que tem o objetivo de saber quantos pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) apresentam alterações nos níveis de gordura no sangue, se esta alteração é em decorrência do uso de medicamentos antirretrovirais e a análise de um fator genético associado às alterações nos níveis de lipídeos (dislipidemias) como o gene do receptor da lipoproteína de baixa densidade (LDL), conhecido como o “colesterol ruim”. Para participar do projeto, será necessária a coleta dos dados como peso, altura e cálculo do índice de massa corpórea ($IMC = \text{peso}/\text{altura}^2$); circunferência abdominal e medida de pressão arterial. Também será necessária a coleta uma pequena amostra de sangue para realização das provas bioquímicas (colesterol, glicose, insulina, ácido úrico e avaliação do estresse oxidativo) e genéticas (gene do receptor do LDL). A coleta dos dados e da amostra de sangue será efetuada no mesmo dia em que o senhor (a) será atendido pelo serviço especializado para a realização dos exames de rotina do monitoramento do seu tratamento. Não haverá necessidade de agendar outros dias para coletas específicas para este projeto de pesquisa.

Os dados pessoais fornecidos e os resultados do exame realizado serão mantidos sob sigilo e somente serão utilizados para fins de pesquisa. Durante todas as etapas do projeto, os participantes serão identificados por um número codificado que será utilizado nas análises posteriores para garantir a preservação da integridade do indivíduo, garantir o anonimato e evitar a quebra de confidencialidade. Ao final do projeto, os resultados serão divulgados em forma de artigos científicos e comunicações em eventos científicos, sempre mantendo o sigilo da identidade dos participantes e as amostras de material biológico coletadas serão descartadas em local apropriado de descarte de

material biológico (sangue, soro, plasma e DNA) dos laboratórios envolvidos, seguindo as normas de biossegurança padronizada no Hospital Universitário.

Declara que está completamente esclarecido sobre a forma como a pesquisa será realizada, não tenho nenhuma dúvida sobre sua natureza e os procedimentos, sem risco, aos quais será submetido. Declara também que está ciente de que sua participação é voluntária, de que será informado sobre os resultados dos exames realizados, de não terá nenhum ônus e de que poderá se recusar ou abandonar a pesquisa em qualquer momento sem que haja penalização ou prejuízo algum para seu atendimento e tratamento. Está ciente também que o seu tratamento continuará sendo conduzido pelo seu médico e que nenhum pagamento ou benefício será feito ao participante ou aos familiares pela participação no presente estudo.

Eu estou disposto a participar dessa pesquisa e compreendi as condições acima descritas, concordo voluntariamente a participar desse estudo.

Assinaturas

Paciente ou representante legal (caso o paciente esteja impossibilitado de assinar ou compreender o conteúdo deste TCLE)

Nome: _____

Assinatura: _____

Local e data: Londrina, _____

Profissional que obteve o TCLE

Nome: _____

Assinatura: _____

Local e data: Londrina, _____

Pesquisador responsável: Nome: Professora Dra. Edna Maria Vissoci Reiche

Endereço: Departamento de Patologia, Análises Clínicas do Centro de Ciências da Saúde, Hospital Universitário de Londrina. Av. Robert Koch, 60, Vila Operária, CEP 86038-440 Fone: 43-3371-2321 ou 43-3371-2670

Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina Fone: 43-3371-2490

APÊNDICE B

Questionário

FICHA DE AVALIAÇÃO

Nome:	Prontuário:														
Data de nascimento: Idade:	() Branco () Negro () Amarelo () Pardo														
Telefone casa: Cel:															
Medicamentos: () ARV () Regular () Irregular	Bebida Alcóolica () Sim () Não () 1 vez (semana) () 2 vezes (semana) () 3 vezes (semana) () mais de 3 vezes (semana)														
Outras doenças:															
<table border="1"> <tr><td>Fumante:</td><td>() Sim () Não Quantos:</td></tr> <tr><td>Peso</td><td></td></tr> <tr><td>Altura</td><td></td></tr> <tr><td>IMC</td><td></td></tr> <tr><td>Pressão Arterial</td><td></td></tr> <tr><td>Circunferência Abdominal</td><td></td></tr> <tr><td>Atividade Física:</td><td>() 1 vez () 2 Vezes () 3 Vezes () Mais Vezes</td></tr> </table>		Fumante:	() Sim () Não Quantos:	Peso		Altura		IMC		Pressão Arterial		Circunferência Abdominal		Atividade Física:	() 1 vez () 2 Vezes () 3 Vezes () Mais Vezes
Fumante:	() Sim () Não Quantos:														
Peso															
Altura															
IMC															
Pressão Arterial															
Circunferência Abdominal															
Atividade Física:	() 1 vez () 2 Vezes () 3 Vezes () Mais Vezes														