



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA
MESTRADO PROFISSIONAL EM FARMACOLOGIA CLÍNICA

**ESTUDO DOS POSSÍVEIS EFEITOS MUTAGÊNICO DO HIV E DE ESQUEMAS
ANTIRRETROVIRAIS CONTENDO ZIDOVUDINA**

ELNA JOELANE LOPES DA SILVA DO AMARAL

FORTALEZA

2014

ELNA JOELANE LOPES DA SILVA DO AMARAL

**ESTUDO DOS POSSÍVEIS EFEITOS MUTAGÊNICO DO HIV E DE ESQUEMAS
ANTIRRETROVIRAIS CONTENDO ZIDOVUDINA**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Farmacologia Clínica.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes

FORTALEZA

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A513e Amaral, Elna Joelane Lopes da Silva do.

Estudo dos possíveis efeitos mutagênico do HIV e de esquemas antirretrovirais contendo zidovudina / Elna Joelane Lopes da Silva do Amaral. – 2014.
83 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Mestrado Profissional em Farmacologia Clínica, Fortaleza, 2014.
Orientação: Profa. Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes.

1. Nucleosídeos. 2. HIV. 3. Antirretrovirais.. I. Título.

CDD 615.1

ELNA JOELANE LOPES DA SILVA DO AMARAL

**ESTUDO DOS POSSÍVEIS EFEITOS MUTAGÊNICO DO HIV E DE ESQUEMAS
ANTIRRETROVIRAIS CONTENDO ZIDOVUDINA**

Dissertação submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca de Ciências da Saúde da referida Universidade.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Gisela Costa Camarão
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Danielle Macêdo Gaspar
Universidade Federal do Ceará (UFC)

EPÍGRAFE

“A ciência fez muito, mas não o suficiente. Houve a identificação do vírus (HIV), o teste de soropositividade, os remédios. Tudo isso permitiu a prevenção, o tratamento. Mas, apesar dos esforços, a epidemia continua. Nós ainda não sabemos de tudo o que precisamos nem sobre o vírus nem sobre a doença.”

(Luc Montagnier)

DEDICATÓRIA

Ao meu esposo Fabrício Amaral, por sua existência, por estar sempre ao meu lado, pelo companheirismo, respeito e incentivo, Também pela paciência e sabedoria para transmitir seus conhecimentos e experiências, cruciais na elaboração deste trabalho. Obrigada, meu amor!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me permitir viver cada momento de forma intensa.

Aos meus Pais (Ana Maria e Joel Silva) e irmãos (Joelson Giordani e Lorena Iaci), por me compreenderem e estarem ao meu lado em todos os momentos.

Às minhas avós Maria Pires (*in memoriam*) e Francisca Diogo (*in memoriam*) duas grandes lutadoras que me ensinaram, com exemplos, a ter disciplina e não desistir nunca.

Aos meus tios, primos e cunhados (todos, sem exceção) pelo apoio e torcida por meu crescimento profissional.

Aos meus filhos Artur e Álvaro, pelo carinho e por estarem no meu colo (literalmente) durante boa parte da elaboração deste trabalho.

A todos os professores do mestrado, em especial a minha orientadora Maria Elisabete Amaral de Moraes, pelos direcionamentos indispensáveis para a conclusão deste trabalho.

A doutora Tatiana Chaves, por acreditar no mestrado e não medir esforços para que ele se tornasse realidade.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para que este trabalho se tornasse realidade, meus sinceros agradecimentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) e Instituto Claude Bernard (InCB) pela colaboração financeira e incentivo ao desenvolvimento da pesquisa no Brasil.

SUMÁRIO

I.	Introdução	12
	1. Vírus da imunodeficiência humana (HIV)	12
	1.1 Descoberta	12
	1.2 Morfologia	13
	1.3 Organização genômica	15
	1.4 Ciclo viral e replicação	16
	2 HIV e neoplasias	17
	3 Fármacos utilizados no tratamento da infecção pelo HIV	22
	3.1 Inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (ITRN) e nucleotídeos (ITRNT)	22
	3.2 Inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos (ITRNN)	24
	3.3 Outras classes de medicamentos utilizados na terapia antirretroviral	24
	4 Princípios da terapia antirretroviral	26
	5 Terapia antirretroviral e neoplasias	28
	6 Biomarcadores de efeito	31
	6.1 Teste de micronúcleo	31
II	Justificativa	34
III	Objetivos	35
	1 Objetivo geral	35
	2 Objetivos específicos	35
IV	Protocolo de estudo	36
	1 Tipo de estudo	36
	2 Local do estudo	36
	3 Aspectos éticos	36
	4 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	37
	5 Confidencialidade	37
	6 Caracterização do estudo	37
	6.1 Seleção dos sujeitos da pesquisa	37
	7. Delineamento do estudo	39
	8. Variáveis do estudo	39
	9. Protocolo experimental	40

10. Procedimento com os voluntários	40
10.1 Procedimento de coleta	40
10.2 Coleta e transporte das amostras	41
11. Teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese	41
12. Análise estatística	42
V Resultados e discussão	43
1 Análise da população estudada	43
2 Análises mutagênicas: frequências de micronúcleos em 2000 (duas mil) células binucleadas	48
VI Conclusão	62
VII Recomendações	63
Bibliografia	64
Apêndices	69
Anexo	80

RESUMO

Estudo dos possíveis efeitos mutagênico do HIV e de esquemas antirretrovirais contendo zidovudina. Elna Joelane Lopes Da Silva Do Amaral. Orientadora: Prof. Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes. Dissertação de Mestrado em Farmacologia Clínica. Departamento de Fisiologia e Farmacologia. Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Ceará, 2014.

O vírus HIV está associado a mutações genéticas e incidência de neoplasias, tais como o sarcoma de Kaposi, maior do que o que seria esperado na população normal. Paradoxalmente, o seu tratamento, especialmente com análogos de nucleosídeos (zidovudina e tenofovir), em vez de diminuir esse risco, parece aumentar. Existem poucos estudos em seres humanos que têm abordado efeitos genotóxicos de antirretrovirais, e a maioria foi realizada *in vitro* e em animais experimentais. O presente estudo investigou o possível efeito genotóxico de esquemas antirretrovirais contendo zidovudina e tenofovir em pessoas com HIV / AIDS. Quarenta voluntários participaram do estudo, divididos em quatro grupos. Grupo I, de pacientes HIV positivos atendidos em um ambulatório, sem indicação para o uso de um esquema antirretroviral; grupo II consistiu em indivíduos submetidos ao tratamento e acompanhamento ambulatorial (zidovudina, lamivudina e efavirenz), grupo III foi composta por indivíduos que recebem tratamento e acompanhamento ambulatorial (tenofovir, lamivudina e efavirenz) e grupo IV, constituída de indivíduos soronegativos (grupo controle). Resultados: A presença do vírus HIV em seres humanos aumentou significativamente a frequência de micronúcleos. No entanto, em indivíduos que usaram esquemas contendo zidovudina, a frequência não foi significativamente maior quando comparados a indivíduos com HIV que não receberam terapia antirretroviral. Além disso, não houve impacto sobre o número de micronúcleos, quando se comparou o grupo da zidovudina com o grupo de tenofovir. Embora o uso de tenofovir tenha levado a uma produção de micronúcleos que foi significativamente superior quando comparada com sujeitos que não têm o HIV, quando comparada com os indivíduos que têm HIV e não utilizar um regime antirretroviral, o regime de tenofovir conduziu a uma produção significativamente menor micronúcleos. Podemos concluir que

o regime de tenofovir parece ser o mais vantajoso para o não aparecimento de alterações genéticas e é, por conseguinte, mais seguro.

Palavras-chave: Nucleosídeos; HIV; Antirretrovirais.

ABSTRACT

Possible mutagenic effects study of HIV and antiretroviral regimens containing zidovudine. Elna Joelane Lopes da Silva do Amaral. Supervisor: PhD. Professor Maria Elisabete Amaral de Moraes. Dissertation in Clinical Pharmacology. Department of Physiology and Pharmacology. Faculty of Medicine. Federal University of Ceará, 2014.

The HIV virus is associated with genetic mutations and a higher than normal incidence of cancers such as Kaposi sarcoma. Paradoxically, its treatment, especially with nucleoside analogs (zidovudine and tenofovir), instead of decreasing this risk, seems to increase it. There are only a few studies in humans that have addressed genotoxic effects, and most were carried out in vitro and in experimental animals. This study investigated the possible genotoxic effect of antiretroviral regimens containing zidovudine and tenofovir in people with HIV/AIDS. Forty volunteers participated in the study, divided into four groups. Group I consisted of HIV positive patients attending an outpatient clinic without indication for use of an antiretroviral regimen; group II consisted of individuals undergoing treatment and outpatient monitoring (zidovudine, lamivudine and efavirenz); group III consisted of individuals receiving treatment and outpatient monitoring (tenofovir, lamivudine and efavirenz) and group IV consisted of subjects who were known to not be HIV positive. Results: The presence of the HIV virus in humans significantly increased the frequency of micronuclei. However, in individuals who used regimens containing zidovudine, the frequency was not significantly higher when compared to individuals with HIV who were not receiving antiretroviral therapy. Moreover, there was no impact on the number of micronuclei when comparing the zidovudine group with the tenofovir group. Although the use of tenofovir led to a production of micronuclei that was significantly higher when compared to subjects who did not have HIV, when compared to individuals who have HIV and do not use an antiretroviral regimen, the tenofovir regimen led to a significantly smaller production of micronuclei. Conclusion: The tenofovir regimen seems to be the most advantageous for the non-appearance of genetic alterations and is, therefore, safer.

Keywords: Nucleosides; HIV; Antiretroviral.

I. INTRODUÇÃO

1. Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)

1.1 Descoberta

Em 1981, um número incomum de jovens homossexuais masculinos americanos foi afetado por uma infecção respiratória muito rara causada pelo fungo *Pneumocystis carinii*. Logo se observou casos também em haitianos, viciados em heroína e hemofílicos residentes nos Estados Unidos (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2006; LOMAR et al, 2007; SABINO; BARRETO; SANABANI, 2009; RIBEIRO; VERAS; GUERRA, 2009).

Em 1981 o boletim do Centers for Diseases Control (CDC) publicou o relato dos cinco primeiros casos desta nova síndrome e nos meses e anos subsequentes, centenas de casos foram diagnosticadas. Todos tinham em comum uma inversão da relação de linfócitos CD4 e CD8, e a doença acabou sendo denominada de AIDS (sigla de *Acquired Immunodeficiency Syndrome* ou Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) (LOMAR et al, 2007; RIBEIRO; VERAS; GUERRA, 2009).

Esta doença misteriosa se disseminou rapidamente e aos poucos atingiu também mulheres parceiras sexuais de indivíduos que apresentavam a doença e crianças (LOMAR et al, 2007; RIBEIRO; VERAS; GUERRA, 2009). Associado a essa disseminação também se observou outras doenças oportunistas, como as causas por micobactérias atípicas, tuberculose extrapulmonar, doença fúngica invasiva, sarcoma de Kaposi, toxoplasmose cerebral e linfoma não-Hodgkin (LOMAR et al, 2007; RIBEIRO; VERAS; GUERRA, 2009).

A identificação do agente causal ocorreu em 1983, quando simultaneamente Montagnier e associados em Paris, e Gallo e colegas, nos Estados Unidos, relataram o isolamento do vírus causador de um quadro de imunodeficiência humana em pacientes

com linfadenopatia persistente e em um paciente com Aids, respectivamente (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2006; LOMAR et al, 2007; SABINO; BARRETO; SANABANI, 2009). Após algumas sugestões, o novo vírus acabou sendo denominado de *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) ou vírus da imunodeficiência humana.

Em 1986, uma variante do HIV foi isolada de dois pacientes com Aids originários da África Ocidental, e recebeu o nome de HIV-2, sendo o primeiro denominado de HIV-1. Ambos diferem no peso molecular de suas proteínas e nos genes acessórios. Além disso, o quadro clínico causado pelo HIV-2 tem curso mais benigno, causando menor grau de imunodeficiência que o HIV (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2006; LOMAR et al, 2007; SABINO; BARRETO; SANABANI, 2009).

Ao que tudo indica, o vírus evoluiu desde a década de 1930, a partir de um vírus símio que, em contato com o homem, sofreu mutações e se adaptou ao organismo humano. A partir de então se disseminou rapidamente, a princípio pela África e depois pelo resto do mundo (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2006).

1.2 Morfologia

Existem vírus RNA que através da enzima DNA polimerase RNA dependente (transcriptase reversa-RT) são capazes de copiar seu genoma de RNA em uma dupla fita de DNA e integrar-se ao genoma da célula hospedeira (SABINO; BARRETO; SANABANI, 2009). Vírus com estas características são denominados retrovírus, que pela classificação atual estão divididos em sete grupos: alfarretrovírus (vírus da leucemia aviária), betarretrovírus (vírus do tumor mamário dos ratos), gamarretrovírus (vírus da leucemia de camundongos e vírus da leucemia felina), deltarretrovírus (vírus da leucemia bovina e os vírus HTLV, que afetam humanos), epsilonretrovírus, lentivírus (HIV e vírus da imunodeficiência de felinos e símios) e spumavírus (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2006).

O primeiro retrovírus isolado foi o vírus do sarcoma de Rous, causador de tumores sólidos em galinhas. Retrovírus causadores de câncer tem sido, desde então, isolados a partir de outras espécies animais e são classificados como vírus tumorais de RNA ou oncornavírus. Muitos desses vírus alteram o crescimento celular através de

expressão de análogos de genes controladores do crescimento celular – oncogenes (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2006).

O HIV é um retrovírus de aproximadamente 100nm de diâmetro, envelopado, apresentando glicoproteínas virais em sua superfície (Figura 1). Estas são adquiridas por brotamento a partir da membrana plasmática da célula do hospedeiro e são denominadas gp41 e gp120. Internamente à esta membrana está a matriz proteica, formada pela proteína p17 e o capsídeo viral de forma cônica, composta pela proteína p24 (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2006; SABINO; BARRETO; SANABANI, 2009).

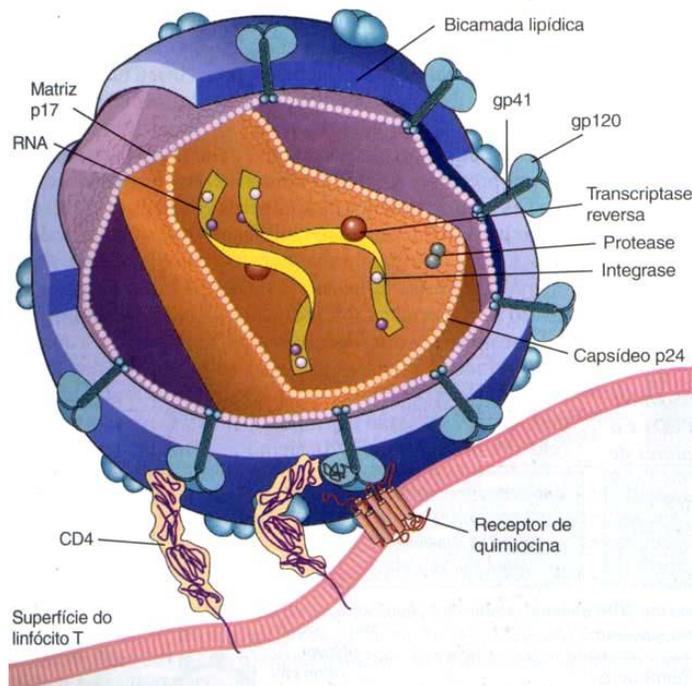


Figura 1: Estrutura simplificada do HIV tipo 1

Fonte: <http://www.icb.ufmg.br/biq/prodabi6/grupos/grupo1/1.jpg>

No interior do capsídeo viral encontram-se duas cópias idênticas do genoma de RNA de fita positiva. Também no interior do capsídeo encontram-se entre 10 e 50 cópias das enzimas transcriptase reversa e integrase e dois RNAs de transferências celulares (tRNAs). Estes estão associados a cada cópia do genoma por pareamento de bases e servem como iniciadores para a transcriptase reversa. Durante a replicação, a cópia de DNA do genoma viral é integrada ao cromossomo da célula hospedeira,

tornando-se um gene celular (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2006).

1.3 Organização genômica:

O genoma do HIV tem aproximadamente 10 kilobases (kb) e contém 9 genes: os que codificam as proteínas estruturais (*gag*, *pol* e *env*) e os que codificam proteínas não estruturais (*tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpu*, e *vpr*) (SABINO; BARRETO; SANABANI, 2009) (Figura 2). No genoma observam-se duas regiões denominadas *Long Terminal Repeats* (LTR) onde estão presentes elementos de controle para integração, transcrição e poliadenilação dos RNA mensageiros (SABINO; BARRETO; SANABANI, 2009).

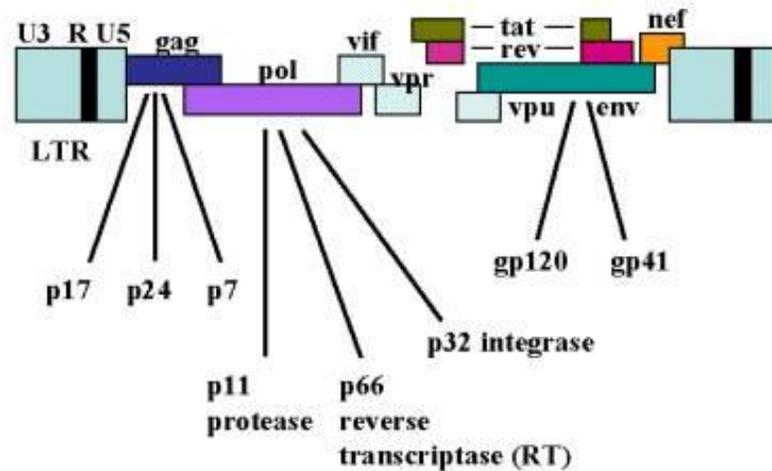


Figura 2: Organização genômica do HIV.

Fonte: http://hivmedicine.aidsportugal.com/html/03_Pathophys.html

O gene *gag* (antígeno de grupo) codifica a matriz proteica (MA ou p17) e o capsídeo viral (CA ou p24) e as proteínas nucleares (NC ou p6 e p7). O gene *pol* (polimerase) codifica a transcriptase reversa (RT ou p51/ p66), a protease (PR ou p10) e a integrase (IN ou p32). O gene *env* (envelope) codifica uma proteína inicial de 160kb, que é clivada, dando origem à proteína de transmembrana (TM ou g41) e à proteína de superfície (SU ou gp120) (SABINO; BARRETO; SANABANI, 2009).

Os genes não estruturais subdividem-se em regulatórios (*tat* e *rev*) e em genes acessórios (*vif*, *vpu*, *vpr* e *nef*), cada um com funções bem específicas: o gene *rev* (p19)

regula a expressão do RNA mensageiro; O *tat* (p14) é responsável pela transativação ou replicação dos componentes genéticos do vírus; o *vif* (p 23) é responsável pelo fator de infectividade; o *vpr* atua na replicação viral e ajuda na infecção de macrófagos; o *vpu* (p 15) atua na liberação da partícula viral e o *nef* (p27) atua aumentando ou diminuindo a expressão viral (SABINO; BARRETO; SANABANI, 2009).

1.4 Ciclo viral e replicação:

O HIV penetra na célula hospedeira através da ligação da proteína de superfície do vírus (gp 120) com os receptores da referida célula, denominados CD4, CXCR4 e CCR5 (SABINO; BARRETO; SANABANI, 2009) (Figura 3).

Nas 6 horas seguintes à entrada do vírus na célula, o RNA viral é convertido em DNA pela enzima transcriptase reversa ainda no citoplasma da célula. No interior do núcleo, a dupla fita de DNA formada é integrada de forma randômica ao genoma do hospedeiro através da enzima integrase. Uma vez integrado, o DNA viral permanece na célula enquanto ela estiver viva (SABINO; BARRETO; SANABANI, 2009).

O acúmulo da proteína p14 (Tat) no núcleo da célula aumenta a transcrição da proteína p19 (Rev), que regula a expressão do RNAm, levando à produção das proteínas estruturais. Após a síntese da proteína precursora do *gag*, esta é direcionada à membrana celular para montagem da partícula viral, onde o vírus é liberado por brotamento; durante esta fase, a enzima protease processa as proteínas precursoras do *pol* e *gag*, tornando a partícula viral madura e capaz de infectar uma nova célula (SABINO; BARRETO; SANABANI, 2009).

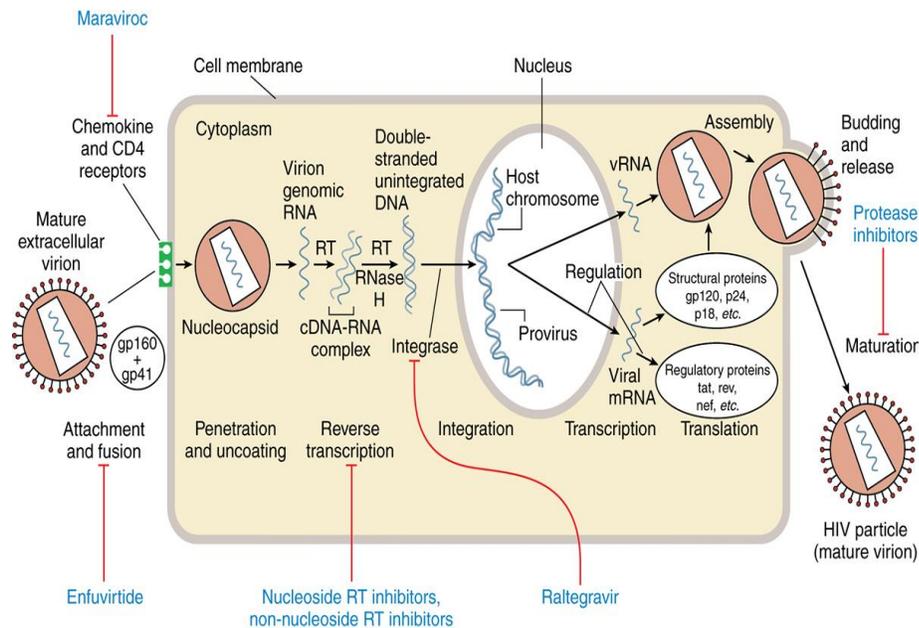


Figura 3: Ciclo de replicação do HIV tipo 1, mostrando os locais de ação dos agentes antirretrovirais disponíveis. Os agentes antirretrovirais disponíveis estão indicados em azul (Fonte: Flexner, 2012, p. 1624).

2 HIV e neoplasias

Aproximadamente 15% dos cânceres humanos são associados a infecções por vírus. As infecções virais são consideradas o mais importante fator de risco passível de controle no desenvolvimento do câncer, superado apenas pelo consumo do tabaco (VILLA e BOCCARDO, 2004).

Os vírus causadores de tumores pertencem a dois grupos: os vírus cujo genoma é constituído de RNA, incluindo os retrovírus, e os vírus pequenos de DNA. Os retrovírus podem ser classificados como simples ou complexos, segundo a sua organização genômica. Os retrovírus simples carregam homólogos de genes celulares (oncogenes) e são capazes de causar transformação celular tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Os retrovírus complexos têm a capacidade de transformação celular associada à função de genes de origem viral. Outros retrovírus que não carregam genes com capacidade oncogênica são capazes de induzir a transformação celular pela integração do provírus na proximidade de proto-oncogenes celulares normais, alterando sua expressão e/ou atividade (ativação insercional) (VILLA e BOCCARDO, 2004).

Evidências obtidas na década de 1990 fornecem indicações claras de que o sistema imune humano exerce um importante papel na eliminação do câncer (WEINBERG, 2008). Isso ocorre pelo envolvimento de dois mecanismos: (1) na ausência de sistema imune completamente funcional, muitos vírus, incluindo os oncogênicos, são capazes de persistir e proliferar por longos períodos no organismo; (2) Alternativamente, o sistema imune normal é responsável por reconhecer e eliminar células transformadas por vírus. Em indivíduos imunocomprometidos, essas células podem ser capazes de sobreviver indefinidamente (WEINBERG, 2008). Além disso, as neoplasias em geral estão intimamente ligadas à instabilidade genômica e aos mecanismos de reparo do DNA. Este último mantém a estabilidade do genoma e serve como uma barreira, evitando que mutações possam levar a câncer.

A relação entre HIV e ocorrência de tumores ficou evidente desde os primeiros casos de Aids relatados. Muitos dos homossexuais masculinos com fase avançada de imunossupressão apresentaram um raro tipo de tumor endotelial chamado Sarcoma de Kaposi. Estes pacientes também apresentaram um aumento no número de casos de cânceres já conhecidos como linfomas não Hodgkin e carcinoma invasivo de colo uterino, levando à inclusão destes tumores como doenças definidoras de Aids já no início dos anos 1990 (VILLA e BOCCARDO, 2004; NUNNARI; SMITH; DANIEL, 2008; SABINO; BARRETO; SANABANI, 2009).

Os pacientes infectados desenvolvem linfomas com frequência relativamente maior do que na população em geral. Três em cada 100 indivíduos infectados com HIV tem como manifestação inicial de Aids o linfoma não-Hodgkin. Da mesma forma que o sarcoma de Kaposi, em que há associação entre herpes vírus 8 e HIV, o linfoma não-Hodgkin em pacientes infectados com HIV também está associado à infecção viral, neste caso, ao vírus Epstein-Barr (NUNNARI; SMITH; DANIEL, 2008).

O carcinoma invasivo do colo do útero é uma das complicações mais frequentes da infecção HIV nos países em desenvolvimento. Este tipo de câncer está associado com a infecção pelo HPV e curiosamente a ocorrência deste tipo de câncer não depende da supressão imune. A doença é agressiva, menos sensível ao tratamento e, muitas vezes, recorrente em mulheres infectadas pelo HIV. Não há nenhuma diferença

em termos de gravidade do carcinoma invasivo do colo do útero em pacientes assintomáticos com infecção pelo HIV e nas pacientes com Aids. Estes dados indicam que uma falha de vigilância imunológica não é o único mecanismo por trás do desenvolvimento deste câncer em Aids, e não é dependente de supressão imune. Em contraste, parece provável que a infecção pelo HIV e a presença de suas proteínas contribuem para o desenvolvimento do carcinoma invasivo do colo do útero nestas pacientes. Esta hipótese é apoiada pela função de Tat observada no desenvolvimento do sarcoma de Kaposi (NUNNARI; SMITH; DANIEL, 2008).

Nunnari, Smith e Daniel (2008) relataram a recém-descoberta proteína Tat do HIV, assim como os cofatores celulares associados a esta proteína e à pausa no reparo da fita dupla de DNA. Eles propõem que as deficiências na reparação do DNA induzidas por esta proteína podem desempenhar um papel significativo no desenvolvimento de neoplasias associadas ao HIV.

O sarcoma de Kaposi, por exemplo, tem o envolvimento direto do HIV na sua gênese devido ao efeito promotor da proliferação celular da proteína Tat do HIV, levando a uma maior incidência e ao crescimento agressivo deste tipo de câncer (VILLA e BOCCARDO, 2004; NUNNARI; SMITH; DANIEL, 2008). O Sarcoma de Kaposi é a malignidade mais comum associado com infecção VIH-1. Este tipo de sarcoma pode ocorrer em qualquer fase da infecção, mas ocorre com maior frequência nos estágios tardios da Aids, associados à imunossupressão grave. Caracteriza-se pela proliferação de células fusiformes, que parecem ser de origem endotelial linfático. A patogênese viral do herpes vírus 8 juntamente com a proteína Tat do HIV contribuem fortemente com o sarcoma de Kaposi. O Tat é libertado a partir de células de HIV-1 infectada e podem se ligar a superfícies celulares e penetrar nas células não infectadas, principalmente nas células endoteliais. O Tat induz a angiogênese e estimula o crescimento de células fusiformes, funcionando como um cofator no desenvolvimento do Sarcoma de Kaposi. (NUNNARI; SMITH; DANIEL, 2008)

Estudos mostram que a proteína Tat induz a expressão do gene da DNA beta-polimerase, que codifica uma proteína chave na via de reparação na base de clivagem do DNA. A expressão deste gene foi comprovadamente aumentada em linfomas

relacionados com Aids. Além da regulação do gene da DNA beta-polimerase, Tat também foi implicada na reparação na quebra da dupla fita de DNA (NUNNARI; SMITH; DANIEL, 2008).

Também há relatos de aumento na incidência de câncer colorretal em pacientes sobreviventes de Aids em longo prazo. O câncer colorretal não tem uma etiologia reconhecidamente viral, mas acredita-se que a proteína Tat pode desempenhar um papel no desenvolvimento deste tipo de câncer em pacientes infectados pelo HIV (NUNNARI; SMITH; DANIEL, 2008).

O vasto uso de antibióticos, antifúngicos e antivirais está aumentando o tempo de vida das pessoas imunocomprometidas e com os pacientes infectados por HIV não é diferente. Esses períodos prolongados de sobrevivência dos pacientes imunocomprometidos representam intervalos de tempo suficientes para a progressão das lesões pré-malignas que estavam latentes nesses indivíduos, avançando para um estado clinicamente aparente (WEINBERG, 2008).

Afonso *et al.* (2007) afirmam que retrovírus, dentre estes o HIV, utilizam-se de complexos motores moleculares presentes nas células (microtúbulos) para direcionar o seu material genético através do citoplasma em direção ao núcleo. É também através dos microtúbulos que as proteínas virais sintetizadas no citoplasma e o RNA genômico do vírus se deslocam até o local onde a encapsulação ocorre. O centróssomo representa um local ótimo através do qual os vírus, ao entrar nas células, podem facilmente ter acesso ao núcleo e através do qual os componentes virais recém-sintetizados podem trafegar para atingir a montagem viral e os locais de brotamento. Tudo indica que importinas ou transporte dineína-mediado podem estar envolvidos neste processo (AFONSO *et al.*, 2007).

O centróssoma também parece ser o local subcelular em que as poliproteínas Gag do HIV-1 são sintetizadas e se ligam ao RNA genômico viral, iniciando assim encapsulação e montagem da partícula viral. Além disso, o centróssoma tem uma grande concentração local de chaperonas, proteínas que auxiliam no enovelamento proteico, essenciais na dobragem do Gag e posterior formação do capsídeo.

Estudos iniciais relataram que a proteína viral R do HIV (Vpr) era uma proteína oncogênica e sugeriu que poderia ser responsável por alguns tipos de câncer associados a Aids. Até então, vários grupos relataram a presença de múltiplos centrossomos e, por conseguinte aneuploidia, assim como micronúcleos em células que expressam Vpr. (AFONSO *et al.*, 2007). A Vpr parece induzir um deslocamento do polo Plk1/Plo1, um componente do centrossoma, que geralmente está localizado no corpo do fuso. O Plo1 é um regulador dos vários aspectos da divisão celular, incluindo a entrada em mitose, a montagem do fuso mitótico, maturação do centrossomo, a saída de mitose e a citocinese. Por isso, a sua dissociação do centrossomo leva a alterações de toda a função centrossomal. No entanto, não se pode excluir a possibilidade da poliploidia associada ao Vpr ser decorrente de alterações do ciclo celular induzida pelo vírus, com desacoplamento dos ciclos centrossomal e nuclear. (AFONSO *et al.*, 2007).

De fato, a infecção pelo HIV-1 dificulta a progressão do ciclo celular e as células infectadas acumulam anormalidades na fase G2 *in vitro* (AFONSO *et al.*, 2007), (SHIMURA *et al.*, 1999). Embora tenha sido demonstrado que várias proteínas de HIV-1 bloqueiam o ciclo celular de forma independente, a Vpr é considerada a principal determinante viral responsável por este bloqueio. Por análise mutacional, foi demonstrado que o domínio C-terminal da Vpr é responsável pela pausa do ciclo celular. Além disso, verificou-se que a fosforilação da Vpr é necessária para esta função. Seguindo-se à expressão do Vpr, o acúmulo de células na fase G2 correlaciona-se com a inativação do fator promotor de mitose (FPM), que normalmente ocorre no centrossoma (AFONSO *et al.*, 2007) Isso leva a formação de micronúcleos e aneuploidia, além de induzir a quebras cromossômicas e amplificação do gene (SHIMURA *et al.*, 1999).

Dois tipos de agentes mutagênicos, aneuploidogênicos e clastogênicos, são conhecidos por gerar a formação de micronúcleos. Os aneuploidogênicos induzem à formação de micronúcleos que são altamente positivo para cinetocoro, um componente centromérico (aproximadamente 90% de frequência). Por outro lado, os clastogênicos provocam micronúcleos cinetocoro-positivos em baixa frequência (aproximadamente 10%). A partir de um estudo realizado por Shimura *et al* (1999) ficou comprovado que o Vpr é um agente mutagênico principalmente clastogênico, pois micronúcleos cinetocoro-

positivos foram observados em apenas 10% dos induzidos por Vpr.

3 Fármacos utilizados no tratamento da infecção pelo HIV

A terapia de combinação antirretroviral (TARV) prolonga a vida e impede a progressão da doença causada pelo HIV. Todavia, o paciente tem que administrá-la ininterruptamente durante toda a vida, para controlar a replicação do vírus. Além disso, há a possibilidade do rápido aparecimento de resistência permanente a esses fármacos, se não forem utilizados de modo apropriado (FLEXNER, 2012). Visto que o tratamento é estendido por anos, o potencial de efeitos adversos adquire importância cada vez maior (APOR e OZZA, 2004; FLEXNER, 2012).

Existem disponíveis para terapia antirretroviral seis classes de medicamentos, cada uma delas responsável por um mecanismo de ação específico.

3.1 Inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (ITRN) e nucleotídeos (ITRNt):

Os inibidores da transcriptase reversa, análogos de nucleosídeos e nucleotídeos, consistem em análogos estruturais dos nucleotídeos ou nucleosídeos que compõem o RNA e o DNA. Estas drogas precisam ser fosforiladas três vezes para entrar em ação. Quando incorporados à cadeia crescente do DNA viral, os falsos nucleotídeos ou falsos nucleosídeos previnem a formação de uma nova ligação 3- 5' fosfodiesterase com o próximo nucleotídeo ou nucleosídeos, causando uma prematura terminação da síntese de cadeia e inibindo efetivamente a replicação viral. O metabolismo dessas drogas depende de enzimas intracelulares, tais como nucleosídeo-cinases, 5-nucleotidases, purina e pirimidina nucleosídeo-fosfato-cinases e enzimas semelhantes. Eles geralmente não são metabolizados pelas enzimas do citocromo P450. (APOR e OZZA, 2004).

Os ITRN e ITRNt podem ser timidínicos ou não timidínicos. Os timidínicos são fosforilados em células ativadas e os não timidínicos são fosforilados, de preferência, em células de memória (KING et al, 2002).

O tenofovir é o único análogo de nucleotídeo. Todos os demais antirretrovirais são análogos de nucleosídeos (FLEXNER, 2012).

Os ITRN são geralmente seguros e bem tolerados, embora existam várias toxicidades potencialmente fatais atribuídos a estas drogas antirretrovirais. O mais notável é a toxicidade mitocondrial (APOR e OZZA, 2004).

Com a exceção de lamivudina e abacavir, os ITRN são inibidores competitivos da gama DNA-polimerase mitocondrial humana, a única enzima responsável pela reparação do dano mitocondrial oxidativo por excisão de bases do DNA. A destruição do DNA mitocondrial associada ao uso de ITRN interrompe a fosforilação oxidativa, conduzindo a efeitos tóxicos pelo acúmulo de ácidos graxos não esterificados, ácidos dicarboxílicos, e radicais livres (APOR e OZZA, 2004).

Os ITRN podem também causar mutações no DNA mitocondrial. Como há uma distribuição desigual de mitocôndrias entre as linhagens celulares, as alterações metabólicas são percebidas de formas diferentes nos diferentes tecidos, seja no tecido nervoso (cérebro, retina, nervo periférico), nos músculos (incluindo o coração), e nos tecidos endócrino, renal, gastrointestinal, hematológica e tecido hepático. Destas, as manifestações graves mais comuns incluem neuropatia periférica, miopatia, acidose láctica, esteatose hepática, pancreatite, lipodistrofia periférica, toxicidade hematopoiética (anemia, neutropenia, trombocitopenia), ototoxicidade e uma miríade de interações medicamentosas (APOR e OZZA, 2004; MENG *et al.*, 2000)

Embora os efeitos em longo prazo da exposição ao AZT em humanos sejam desconhecidos, no tratamento dos pacientes soropositivos com AZT observa-se toxicidade dose-limitante da medula óssea, incluindo anemia, neutropenia e trombocitopenia. A princípio dois mecanismos foram propostos para justificar esta toxicidade. A primeira hipótese é que o dano à medula óssea ocorra devido ao desequilíbrio resultante da inibição da timidina-quinase pelo monofosfato do AZT. No entanto, abordagens experimentais produziram resultados conflitantes, e a causa da toxicidade da medula pelo AZT continua desconhecida. Em contraste, existe evidência substancial que suportar uma segunda hipótese: a incorporação do trifosfato de AZT ao

DNA da célula hospedeira leva a danos genéticos. Incorporação do AZT no DNA celular foi demonstrada em vários sistemas de cultura celular e em ratos expostos transplacentariamente e macacos. A maioria das amostras de leucócitos do sangue periférico de adultos expostos ao AZT ou sangue do cordão umbilical de recém-nascidos tinham AZT detectável em nível de DNA. Há também uma significativa relação entre a extensão da incorporação de AZT no DNA celular e a fracção de sobrevivência clonagênica de células humanas progenitoras da medula óssea (MENG *et al.*, 2000).

3.2 Inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos (ITRNN):

Esta classe de antirretrovirais também tem como enzima alvo a transcriptase reversa contudo, os ITRNN ligam-se diretamente e de forma não competitiva à enzima numa região próxima do local de ligação do substrato para os nucleosídeos. Os complexos resultantes bloqueiam o local de ativação catalisação da transcriptase reversa, fazendo com que reduza drasticamente a polimerização. Em contraste com os ITRN/ITRNT, os ITRNN não requerem ativação intracelular. Como não são incorporados à cadeia de DNA viral ou humana, não trazem as repercussões genotóxicas observadas com a zidovudina (FLEXNER, 2012).

3.3 Outras classes de medicamentos utilizados na terapia antirretroviral.

Outras classes de antirretrovirais também são importantes em algum momento do tratamento. São elas:

- Inibidores da protease: A protease é essencial para a produção de partículas virais maduras. Ela é responsável por clivar a cadeia polipeptídica produzida a partir do material genético viral, dando origem às proteínas estruturais do vírus. Os inibidores da protease ligam-se à protease de forma irreversível, impedindo a sua função (FLEXNER, 2012).

- Inibidores da integrase: A integrase tem como função permitir que o DNA viral se integre ao DNA humano e assim permitir que o vírus possa usar toda a maquinaria

genética das células que infecta para poder se reproduzir. Ao inibir a enzima integrase este medicamento evita a propagação da infecção viral. (Virus and Syndrome, 2011)

- Inibidores de fusão: estes antirretrovirais bloqueiam proteínas de superfície do HIV que são essenciais para a penetração do vírus nas células hospedeiras. Existem medicamentos deste grupo que se ligam especificamente à região HR1 da proteína gp 41 do vírus, bloqueando a entrada do mesmo na célula. Outros funcionam como antagonistas seletivo dos receptores de quimiocinas prevenindo a interação da gp120 com o receptor CCR5, também necessário para a entrada do vírus nas células (BRITO, 2011)

Os medicamentos antirretrovirais aprovados para uso terapêutico estão listados no Quadro 1.

Quadro1: Agentes antirretrovirais aprovados para uso no Brasil.

INIBIDORES DA TRANSCRIPTASE REVERSA		INIBIDORES DA PROTEASE	INIBIDOR ES DA INTEGRA SE	INIBIDORES DE FUSÃO	
ANÁLOGOS DE NUCLEOSÍDEO S E NUCLEOTÍDEO S	NÃO ANÁLOGO S DE NUCLEOSÍ DEOS			BLOQUEA DOR DA GP 41	BOQUEAD OR DO RECEPTO R CCR5
Zidovudina Lamivudina Estavudina Tenofovir* Abacavir Didanosina	Efavirenz Nevirapina Etravirina	Lopinavir Ritonavir Atazanavir Saquinavir Indinavir Fosamprena vir Atazanavir Darunavir	Raltegravir	Enfuvirtida	Maraviroc

*O tenofovir é o único análogo de nucleotídeo

Fonte: Costa, 2013.

4 Princípios da terapia antirretroviral:

A terapia antirretroviral tem por objetivo suprimir a replicação do HIV ao máximo e pelo maior tempo possível.

A decisão quanto ao momento de iniciar a terapia antirretroviral já passou por várias modificações ao longo do período de tratamento. Atualmente o Ministério da Saúde sugere que se inicie a terapia antirretroviral para todo indivíduo soropositivo cuja contagem de células CD4 estiver abaixo de 500 células por mm^3 de sangue. (COSTA, 2013).

A partir de 2014 a medicação será estendida para todos os indivíduos soropositivos assim que receberem o diagnóstico de infecção pelo HIV, conforme determinação do atual Ministro da Saúde, Alexandre Padilha, publicado no Diário Oficial da União, em Dezembro de 2013.

Embora a maioria da terapia antirretroviral seja usada em tratamento crônico da infecção estabelecida, esses medicamentos também podem ser empregados em esquema terapêutico curto para impedir infecção em caso de pós-exposição (acidente com perfurocortantes utilizado em paciente soropositivo, casais sorodiscordantes) e impedir a transmissão vertical (da mãe infectada para a criança, durante a gestação) (FLEXNER, 2012).

Diversos estudos comprovam que é baixa a probabilidade de que o HIV possa ser erradicado com terapia farmacológica, pois as células T quiescentes de longa vida abrigam o DNA do HIV infeccioso integrado ao cromossomo do hospedeiro. Estas células podem sobreviver durante toda a vida do paciente e, como permanecem sem replicação, não é sensível aos antirretrovirais (FLEXNER, 2012).

Os medicamentos recomendados para iniciar a TARV compõem esquemas eficazes, geralmente mais simplificados, menos tóxicos e de menor custo, e pertencem a três classes amplamente utilizadas: Inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos e nucleotídeos (ITRN/ITRNt), inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos (ITRNN); inibidores da protease reforçados com ritonavir (IP/r), este também um inibido da protease.

A terapia inicial deve sempre incluir combinações de três antirretrovirais, sendo dois ITRN/ITRNt associados a um ITRNN ou IP/r.

A associação zidovudina/lamivudina (AZT/3TC) é uma das mais estudadas em ensaios clínicos randomizados: apresenta eficácia e segurança equivalentes a outras combinações de dois ITRN/ITRNt, sendo habitualmente bem tolerada. Está disponível em coformulação no Sistema Único de Saúde (SUS), o que contribui para maior comodidade posológica, devendo-se ingerir 1 comprimido 2 vezes ao dia. É amplamente utilizada, apresenta menor custo comparativo dentro da classe e é produzida no Brasil, o que fortalece a sustentabilidade do acesso universal (COSTA, 2013).

A associação tenofovir com lamivudina (TDF/3TC) apresenta um perfil de toxicidade favorável em relação à hipotrofia e à toxicidade hematológica quando comparado ao AZT, e permite tomada única diária. O TDF é um análogo de nucleotídeo (ITRNt) e sua maior desvantagem é a nefrotoxicidade, particularmente em diabéticos, hipertensos, negros, idosos e no uso concomitante de outros medicamentos nefrotóxicos. Pacientes com doença renal preexistente devem usar preferencialmente outra associação de ITRN. A diminuição da densidade óssea tem sido relacionada ao uso de TDF (COSTA, 2013).

A dupla de ITRN/ITRNt recomendada para compor o esquema de tratamento antirretroviral inicial é AZT/3TC ou TDF/3TC: a decisão deve ser individualizada, de acordo com as características do paciente (COSTA, 2013).

O terceiro antirretroviral do esquema pode ser um ITRNN ou um IP/r. Achados de uma metanálise envolvendo 53 ensaios clínicos randomizados mostraram equivalência na proporção da resposta virológica ao esquema inicial entre pacientes que receberam 2 ITRN/ITRNt + ITRNN (efavirenz) e 2 ITRN/ITRNt + IP/r (COSTA, 2013).

Esquemas estruturados com ITRNN, particularmente com efavirenz (EFZ), possuem melhor perfil de toxicidade, maior comodidade posológica, maiores taxas de adesão ao tratamento em longo prazo, elevada potência de inibição da replicação viral, maior efetividade e maior durabilidade da supressão viral, quando comparados a

esquemas estruturados com inibidores da protease. A longa meia-vida do efavirenz permite a manutenção da supressão da replicação viral caso ocorra irregularidade no horário de tomada de doses, embora possa haver maior risco de falha quando há perda de doses (COSTA, 2013).

5 Terapia antirretroviral e neoplasias

Em estudos realizado por Coté e Biggard (1995), observou-se que as taxas de incidência padronizadas para linfoma não Hodgkin entre pacientes com Aids relativo à população geral sem Aids foi de 222 (190-260, com intervalo de confiança [IC] de 95%) de 1981 a 1986 e taxas ligeiramente inferiores (176-212, com IC de 95%) de 1988 a 1990, quando a zidovudina e outros agentes antirretrovirais entraram no mercado. Com esse estudo fica claro que não foi vista diferença na incidência de linfoma não-Hodgkin relativo àqueles da população geral antes e após a introdução da zidovudina.

Em um grande estudo de caso-controle realizado nos Estados Unidos em pacientes infectados com HIV por Levine *et al* (1995) nenhuma associação foi encontrada entre a incidência de linfoma não-Hodgkin e uso terapêutico de zidovudina. Da mesma forma, nenhum dos estudos da IARC (Agência Internacional Para Pesquisa no Câncer) forneceu informações sobre os riscos de câncer associado com o uso de zidovudina por mais de 3 anos.

A zidovudina foi testada para carcinogenicidade em ratos e camundongos por administração oral e em camundongos por administração vaginal e por exposição transplacentária e pós-natal (IARC, 2000). A administração de zidovudina por gavagem induziu a carcinoma de células escamosas em dois estudos em camundongos (AYERS *et al.*, 1996; BOX, 1999). Uma baixa incidência de tumores vaginais foi observada em ratos tratados com as mais altas doses (AYERS *et al.*, 1996). A administração de zidovudina em camundongos pela via intravaginal resultou em um aumento na incidência de carcinoma de células escamosas da vagina (AYERS *et al.*, 1996). Vale ressaltar que carcinoma de células escamosas é muito raro nesses animais, quando não tratados com medicamentos.

A administração transplacentária em camundongos resultou em um aumento na incidência e multiplicidade de tumores de fígado e pulmão e em um aumento na incidência de tumores do trato reprodutor de fêmeas em um estudo, enquanto que um não aumento na incidência foi associado com o tratamento em outro estudo em uma dose mais baixa (OLIVERO *et al.*, 1997). Após a administração transplacentária e pós-natal de zidovudina a camundongos, foi percebido um aumento na incidência de carcinoma de células escamosas (AYERS *et al.*, 1996).

Apesar de haver evidências insuficientes em humanos para a carcinogenicidade da zidovudina, há evidências suficientes da carcinogenicidade deste medicamento em experimentos em animais. Por isso acredita-se que a zidovudina seja possivelmente carcinogênica em humanos (IARC, 2000).

Em estudo realizado por (LOURENÇO *et al.*, 2010) foi avaliada a as possíveis ações clastogênicas e / ou aneugênicas dos agentes antirretrovirais zidovudina, lamivudina e estavudina com base na formação de micronúcleos em linfócitos humanos, avaliando tanto células binucleadas quanto mononucleadas. A zidovudina e a lamivudina foram genotóxicos apenas em células binucleadas, o que indica que estes medicamentos provavelmente causam a quebra cromossômica em células humanas.

A incorporação da zidovudina no DNA humano induz a mutações nos fosforribosiltransferase (Hprt) e timidina cinase (Tk) genes de hipoxantina-guanina. Além disso, o AZT também induz aberrações cromossômicas, troca de cromátides irmãs e encurtamento dos telômeros em células cultivadas (LOURENÇO *et al.*, 2010). Na verdade, Bayram e Topaktas, 2008 classificaram a lamivudina como um indutor fraco de troca de cromátides irmãs, de formação de aberrações cromossômicas e formação de micronúcleos em linfócitos periféricos humanos *in vitro*. Além de aumentar a frequência de micronúcleos em células binucleadas, a estavudina (um inibidor da transcriptase reversa análogo de nucleotídeos) também afetou as células mononucleares, possivelmente causando perda cromossômica. No entanto, a estavudina não é genotóxico e não causa transformação celular *in vitro*, na maioria dos ensaios de rastreio (LOURENÇO *et al.*, 2010).

Estruturalmente, a principal diferença entre esses três inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos reside na posição 3'-deoxirribonucleosídeo, onde a zidovudina não tem um grupo azido, lamivudina tem um átomo de enxofre e a estavudina tem um grupo 2' 3', didesoxirribose insaturado (Figura 4).

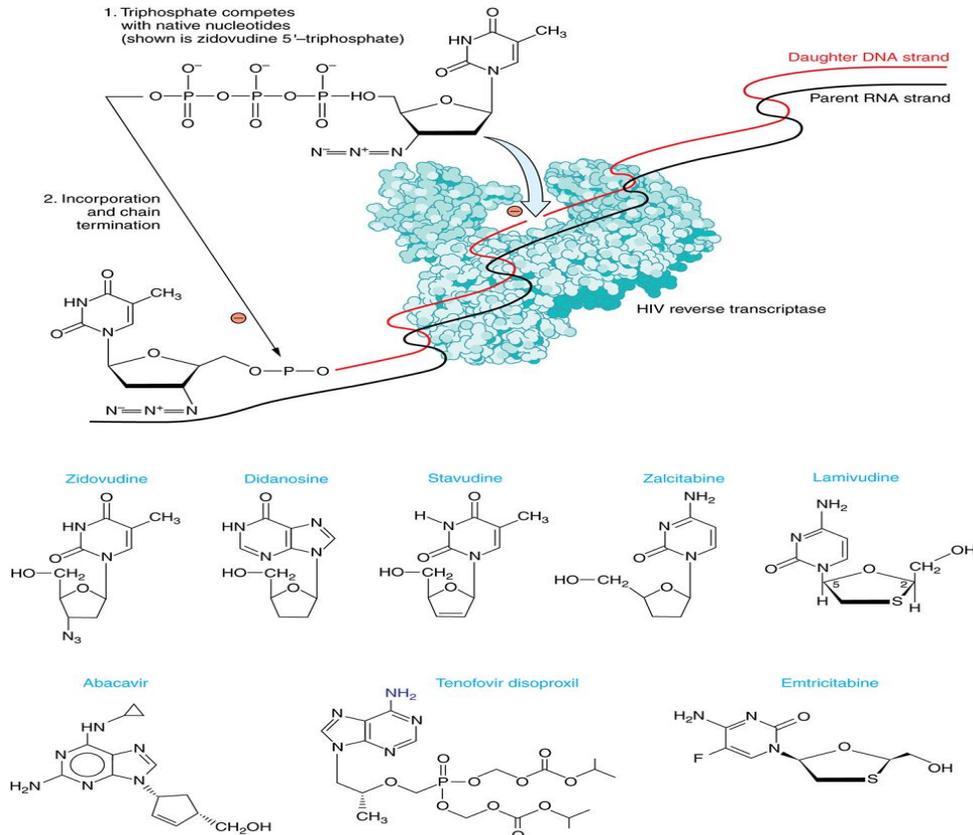


FIGURA 4: Estrutura e mecanismos dos inibidores nucleosídicos e nucleotídicos da transcriptase reversa. Fonte: Flexner, 2012, p. 1629.

Apesar das diferenças estruturais entre AZT e 3TC, não há desvios significativos nos seus efeitos clastogênicos, indicando que nem a azido nem o grupo enxofre interfere na genotoxicidade das drogas. A presença de 2', 3', didesoxirribose em vez do grupo azido ou um átomo de enxofre visto nas outras moléculas atribui uma nova propriedade aneugênica na estavudina só observada em células mononucleadas. (LOURENÇO *et al.*, 2010).

6 Biomarcadores de efeito:

Os biomarcadores de efeito são alterações mensuráveis bioquímicas, psicológicas e comportamentais ou outras alterações que dentro de um organismo, dependendo da magnitude, podem ser reconhecidos como associados a uma deficiência de saúde estabelecida ou possível de doença (SUSPIRO e PRISTA, 2011). Ao avaliar a exposição a diversos agentes, físicos, químicos ou biológicos, os biomarcadores de efeito utilizados para fins de biomonitoramento são na sua maioria relacionados com as propriedades genotóxicos destes agentes.

Os principais biomarcadores de efeitos são: aberrações cromossômicas e teste de micronúcleo (SUSPIRO e PRISTA, 2011).

As aberrações cromossômicas incluem alterações nos números de cromossomos (aberrações), bem como mudanças na estrutura do cromossomo (aberrações estruturais). Eles são avaliados em culturas de linfócitos de sangue periférico estagnados na metáfase e corados, geralmente, por meio da técnica de banda G (Giemsa). Os linfócitos são amplamente utilizados para este fim, uma vez que são amostras fáceis de serem coletadas, tem uma duração de vida razoavelmente longa e circulam por todo o corpo, possivelmente acumulando dano genético à medida que passam através dos tecidos alvos específicos (SUSPIRO e PRISTA, 2011).

6.1 Teste de micronúcleo

Micronúcleos são pequenas coleções de material envoltas no citoplasma nuclear que se separam do núcleo principalmente durante a divisão celular. A formação de micronúcleos em células em divisão resulta ou da quebra cromossômica (clastogênese) ou de separação anômala do cromossomo devido ao mau funcionamento mitótico (aneugênese) (SUSPIRO e PRISTA, 2011).

Conseqüentemente, o conteúdo de micronúcleos pode corresponder a cromossomos inteiros com um centrômero ou como fragmentos cromossômicos acêntricos. O teste mais amplamente utilizado para a detecção de micronúcleos é baseada na estimulação de uma cultura de células da amostra na presença de um agente químico, que inibe a divisão celular, permitindo simultaneamente a divisão nuclear e por

esta razão é também conhecido como teste de micronúcleo com bloqueio de citocinese (CBMN) (SUSPIRO e PRISTA, 2011).

Micronúcleos são contados nas células binucleadas formados e expressos como o número de micronúcleos por 1000 células binucleadas. A contagem de micronúcleos deve incluir somente as células binucleadas para maximizar a sensibilidade e a especificidade do teste, evitando a influência de alterações na cinética da divisão celular (FENECH, 2002; NORPPA, 2003). O teste CBMN é geralmente realizada em linfócitos de sangue periférico, embora outros tipos de células (por exemplo, células epiteliais descamadas da mucosa nasal ou oral), também podem ser usados (SUSPIRO e PRISTA, 2011).

Como foi salientado, o teste CBMN detecta dois tipos diferentes de alterações genéticas: (a) fragmentação de cromossomos resultantes da ação de agentes clastogênicos: os fragmentos acêntricos do cromossomo não podem ser incorporadas no núcleo principal após a divisão celular e, assim, são retidos no citoplasma como micronúcleos sem centrômeros no seu interior (centrômero-negativos); (b) anormalidades afetando segregação dos cromossomas e migração durante a mitose: estas anomalias são associadas a alterações no número de cromossomos no núcleo das células filhas resultantes e, portanto, refletem a ação de agentes aneugênicos (micronúcleos centrômero-positivos). (SUSPIRO e PRISTA, 2011).

O CBMN tem várias vantagens, tais como a velocidade e facilidade de análise, o fato de que requer pequena quantidade de material de amostra e a capacidade de ser realizado em praticamente todos os tipos de células. Além disso, o grande número de células analisadas (1000-3000 por amostra, em comparação, por exemplo, de 100 no ensaio cometa) confere este teste poder estatístico significativo. (PEDERSEN-BJERGAARD *et al.*, 2002). Nos estudos em que o FISH (hibridização fluorescente *in situ*) foi utilizado em associação com CBMN, a maioria dos micronúcleos foram detectados como centrômero negativos, de acordo com as propriedades mutagênicas clastogênicas da maioria dos químicos (CAVALLO *et al.*, 2007)

Várias linhas de evidência apoiam uma associação entre a indução de

micronúcleos e desenvolvimento de câncer. Estudos demonstraram a presença de micronúcleos na maioria (71-86%) das células cancerígenas partir de vários tipos de tumor (GISSELSSON *et al.*, 2001). Micronúcleos também estão presentes com frequência aumentada em linfócitos do sangue periférico de pacientes com câncer (SUSPIRO e PRISTA, 2011).

O CBMN também pode ser observado em células epiteliais da mucosa oral, por exemplo. Todavia, observam-se algumas desvantagens quando comparadas a CBMN em linfócitos de sangue periférico: mesmo assumindo uma maior proximidade à fonte de exposição, a frequência de micronúcleos em células epiteliais é menor e comumente mais difícil de detectar. Efetivamente, os linfócitos do sangue periférico são cultivados e estimulados a dividir e há, por conseguinte a contagem de micronúcleos que são formados *in vitro* durante esta mitose. Quando observado em células epiteliais, por outro lado, apenas os micronúcleos formados *in vivo* são contados (NORPPA, 2003). Além disso, a associação entre a frequência de micronúcleos e aumento do risco de câncer foi estabelecido para linfócitos do sangue periférico e não pode ser prontamente extrapolados para outros tipos de células. É concebível estendê-lo para as células-alvo diretamente envolvidas na carcinogênese (por exemplo, células esfoliadas a partir do trato urinário em indivíduos expostos a ciclofosfamida), mas não para células não alvo, tais como células epiteliais orais ou nasais. Por conseguinte, os linfócitos do sangue periférico devem continuar sendo as células escolhidas para o ensaio CBMN (SUSPIRO e PRISTA, 2011).

II. Justificativa

O diagnóstico de portador do HIV leva a um grande impacto na vida do indivíduo. A sensação de morte próxima e o temor do preconceito que este indivíduo possa vir a sofrer pela sociedade desencadeiam forte preocupação nestes pacientes. O surgimento da terapia antirretroviral de amplo espectro trouxe grande esperança para estes indivíduos, com a promessa não de cura, mas de poder viver uma vida com qualidade e com a sensação de adiamento da morte por tempo indeterminado. Devido a gravidade da doença em muitos pacientes, em 1989 o FDA concordou em liberar o uso de agentes promissores para estes pacientes, mesmo com poucos estudos sobre estes fármacos.

Apesar de haver evidências insuficientes em humanos para a carcinogenicidade da zidovudina, há evidências suficientes da carcinogenicidade deste medicamento em experimentos em animais. Por isso acredita-se que a zidovudina seja possivelmente carcinogênica em humanos.

Este estudo demonstra como identificar precocemente possíveis riscos a saúde de indivíduos soropositivos expostos a esquemas antirretrovirais contendo zidovudina através de um biomonitoramento genotoxicológico e sua possível correlação com a incidência de potencial carcinogênico. Dessa forma, pode-se proporcionar uma melhor qualidade de vida para estes indivíduos, em decorrência da proposta de proteção individual contra medicamentos potencialmente carcinogênico.

III. Objetivos

1. Objetivo geral

Investigar os efeitos genotóxicos de esquemas antirretrovirais contendo zidovudina em humanos.

2. Objetivos específicos

- Comparar o efeito genotóxico do esquema antirretroviral contendo zidovudina com as possíveis alterações genotóxicas provocadas por outro esquema antirretroviral que não contém zidovudina.
- Comparar o efeito genotóxico do esquema antirretroviral contendo zidovudina com as possíveis alterações genotóxicas provocadas pelo vírus HIV.
- Comparar o efeito genotóxico com a carga viral do HIV em indivíduos que ainda não fazem uso de esquema antirretroviral.
- Comparar o efeito genotóxico de esquemas antirretrovirais contendo zidovudina, quando associado ou não associado ao álcool e;
- Comparar o efeito genotóxico do HIV quando associado ao álcool e não associado ao álcool

IV. Protocolo de estudo

1. Tipo de estudo

Este estudo baseia-se num modelo transversal de investigação.

2. Local do estudo

Os indivíduos Voluntários deste estudo foram selecionados no Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella, exceto os do grupo controle. Esta instituição é referência no Estado do Piauí para o tratamento de doenças de infecciosas e parasitárias.

Todas as análises foram realizadas no setor de genética toxicológica do Laboratório Central de Saúde Pública “Dr. Costa Alvarenga” (LACEN –PI).

3. Aspectos éticos

Um plano de atividade foi estabelecido no corpo desse projeto, visando à troca de informação e conjugação de esforços para inteirar experiências acumuladas por seus pesquisadores, sem prejuízo da ação individual e independente de cada uma das partícipes. Todos os indivíduos incluídos neste estudo assinaram termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) antes da coleta de material humano. O projeto foi encaminhado à Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará e foi aprovado com o protocolo de número192/08.

O estudo foi conduzido de acordo com a Declaração de Helsinque (1964) e suas revisões, assim como as regulamentações da CONEPE-CNS-MS.

Os investigadores foram responsáveis por conduzir o estudo em estreita observação ao Protocolo aprovado. Todos os cuidados de biossegurança para o manuseio das amostras foram aplicados.

4. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Os voluntários receberam uma explanação da natureza e dos objetivos do estudo. Os voluntários também foram esclarecidos que eram livres para não participar da pesquisa após este esclarecimento.

Uma vez aprovada a participação do voluntário no estudo, foi solicitado a cada voluntário que assinasse o Termo de Consentimento para participar no estudo, antes da admissão na pesquisa. Foi de responsabilidade do pesquisador a obtenção da assinatura do Termo de Consentimento.

5. Confidencialidade

Toda a informação obtida durante o estudo referente ao estado de saúde do voluntário ficou disponível à pesquisadora, cuja obrigatoriedade de manutenção do sigilo é inerente a sua função.

6. Caracterização do estudo

A pesquisa foi desenvolvida em pacientes com HIV atendidos no ambulatório de HIV/Aids no Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella. Neste ambulatório há a maior concentração de indivíduos soropositivos do Estado do Piauí, envolvendo não só indivíduos piauienses, mas também paraenses e maranhenses, perfazendo um total de aproximadamente três mil pessoas soropositivas atendidas neste serviço.

6.1 Seleção dos sujeitos da pesquisa

Para esta pesquisa foi feito estudo dos linfócitos humanos no sangue periférico de 40 indivíduos, obedecendo aos seguintes critérios de inclusão.

- **Critérios de inclusão:**

- Grupo 1:

- Ter entre 18 e 60 anos.

- Ser soropositivo para HIV
 - Estar em acompanhamento ambulatorial no Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella há pelo menos 06 meses.
 - Não ter feito uso de terapia antirretroviral até o dia da participação no estudo.
- Grupo 2:
 - Ter entre 18 e 60 anos;
 - Ser soropositivo para HIV
 - Estar em acompanhamento ambulatorial no Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella há pelo menos 6 meses.
 - Estar em uso do esquema AZT, 3TC e EFZ há pelo menos 6 meses.
 - Ter carga viral indetectável na última realização do exame.
- Grupo III:
 - Ter entre 18 e 60 anos;
 - Ser soropositivo para HIV;
 - Estar em acompanhamento ambulatorial no Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella há pelo menos 6 meses;
 - Estar em uso do esquema TDF, 3TC e EFZ há pelo menos 6 meses;
 - Ter carga viral indetectável na última realização do exame.
- Grupo IV:
 - Ter entre 18 e 60 anos;
 - Ser soronegativo para HIV

- **Crêterios de exclusão (para os quatro grupos)**
 - Estar com sinais ou sintomas de Aids
 - Ter sido submetido a raios-X, tomografia ou qualquer outro procedimento radiológico há menos de 3 meses.
 - Ter feito tratamento quimioterápico ou radioterápico em algum momento da vida.

7. Delineamento do estudo

O estudo foi composto por quatro grupos distintos. Os componentes do Grupo IV foram selecionados mediante critérios de similaridade ao grupo exposto, tendo como diferença primordial a ausência do vírus HIV e medica es utilizadas (objeto do estudo). As amostras dos demais Grupos estudadas foram escolhidas entre os pacientes soropositivos que fazem acompanhamento ambulatorial no Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella, selecionados em um período de 6 meses.

- Grupo I: Constituído por 07 (sete) indivíduos soropositivos que ainda não iniciaram terapia antirretroviral.
- Grupo II: Constituído por 09 (nove) indivíduos soropositivos em uso de Zidovudina+ Lamivudina + Efavirenz como terapia antirretroviral.
- Grupo III: Constituído por 05 (cinco) indivíduos soropositivos em uso Tenofovir+ Lamivudina+Enfavirenz
- Grupo IV: Constituído por 19 (dezenove) indivíduos sabidamente soronegativos para HIV.

8. Variáveis do estudo

Neste estudo temos os possíveis efeitos genotóxicos da zidovudina como a variável principal a ser investigada. Dentre as variáveis secundárias destacam-se as possíveis altera o gen micas do esquema Tenofovir+Lamivudina+Efavirenz no

tratamento contra HIV e o próprio efeito do vírus em pacientes soropositivos sem uso de terapia antirretroviral.

9. Protocolo experimental

O biomarcador utilizado no biomonitoramento genotoxicológico de indivíduos expostos à terapia antirretroviral foi a frequência de micronúcleos por método convencional.

Micronúcleos são estruturas que resultam de fragmentos cromossômicos ou de cromossomos inteiros que se perdem na divisão celular e, assim, não são incluídos nos núcleos das células filhas, permanecendo no citoplasma das células interfásicas. Refletem, portanto, a ocorrência de danos estruturais e de aneuploidia, permitindo, conseqüentemente, detectar a ação de agentes clastogênicos e aneugênicos (FENECH, 2007).

Nas preparações citológicas destinadas ao estudo de micronúcleos, podem ser encontradas alterações nucleares degenerativas que são, também, indicativas de genotoxicidade. Estas alterações devem ser consideradas, quando da análise de MN, e computadas separadamente, permitindo otimizar a sensibilidade e a especificidade do teste (FENECH, 2007).

10 Procedimento com os voluntários

Todos os sujeitos participantes foram esclarecidos acerca dos objetivos da pesquisa. Responderam a um questionário onde foram indagados sobre seus hábitos, idade, antecedentes ou qualquer outro fator que pudesse influir no resultado da pesquisa e assinaram um termo de consentimento, declarando estar ciente de todos os propósitos do estudo. A amostra obtida foi usada exclusivamente para execução desta pesquisa e os dados obtidos foram encaminhados para revistas especializadas, sendo mantido o sigilo e respeitada a privacidade dos voluntários. Estes poderão a qualquer tempo solicitar informações sobre procedimentos e benefícios relacionados à pesquisa.

10.1 Procedimento de coleta

Inicialmente, fez-se um contato com os participantes, individualmente. Na ocasião foi enfatizada a importância da pesquisa para os mesmos, visto que são poucos os estudos sobre o HIV e seu tratamento quanto à possibilidade de causar alterações cromossômicas compatíveis com neoplasias. Aos que aceitaram participar, foi aplicado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Para fins de avaliação, foi aplicado um questionário para entrevista (APÊNDICE I) abrangendo questões demográficas, hábitos de vida (alimentares, tabaco, álcool, café), bem como ocupacionais, históricos médicos e familiares, duração da terapia antirretroviral e tipo de medicação antirretroviral para aqueles que fazem uso de tal medicação. O questionário aplicado é baseado nas recomendações da *International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and a Carcinogens* (ICPEMC) (CARRANO e NATARAJAM, 1988). Após preenchimento do questionário, realizou-se a coleta de amostras biológicas dos voluntários para análises laboratoriais.

10.2 Coleta e transporte das amostras

A coleta do material dos indivíduos soropositivos participantes do estudo foi feita por profissionais capacitados do Laboratório do IDTNP, nas dependências do próprio laboratório, após a devida autorização do paciente através da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. A coleta do material dos voluntários soronegativos, incluindo o teste para HIV (ELISA) com o consentimento dos mesmos, foi feita por profissionais capacitados do LACEN-PI.

Foram utilizadas seringas heparinizadas para a coleta de sangue. A quantidade de sangue coletada de cada voluntário foi 5 ml, o necessário para a análise de micronúcleos em linfócitos.

11. Teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese

Para o teste de micronúcleo com bloqueio da citocinese (CBMN), o sangue foi coletado em seringas previamente heparinizadas. Cerca de 0,5 mL de sangue foi colocado em 4-5 mL de RPMI 1640 (mistura de sais enriquecidos com aminoácidos, vitaminas e outros componentes essenciais para o crescimento celular), suplementado

com 15 % de soro bovino fetal, 1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina), 1% de L-glutamina e 1% de fitohemaglutinina. Os linfócitos foram incubados por 7 horas em até 37°C. A citocalasina B foi preparada em DMSO (sulfóxido de dimetilo) na concentração de 6 mg/mL e estocada em 20°C. Essa solução foi adicionada na cultura em 44 horas. Após as 72 horas de incubação as culturas foram centrifugadas em 800 rpm por 8 minutos para eliminar as células vermelhas. As células lavadas em RPMI 1640 e tratadas em um meio hipotônico por 2-3 minutos em 0,075 M de KCL a 4°C. O procedimento foi feito por 3 vezes. As células foram centrifugadas e adicionadas na solução com metanol-ácido acético 3:1 e gentilmente agitadas. Esse processo foi repetido por 3 vezes. As células foram ressuspensas e colocadas em lâminas e coradas com Giemsa a 10% em tampão fosfato a pH 6,8, por 10 minutos. As células foram observadas em microscopia óptica em objetivas de 100 vezes e fotografadas. 1000 células binucleadas com citoplasma preservado foram avaliadas quanto à frequência de micronúcleos.

12. Análise estatística

Para a avaliação de micronúcleos foram utilizadas as seguintes análises estatísticas: teste t de *Student* para comparações da frequência de micronúcleos e de uma forma de análise de variância; ANOVA para os parâmetros da característica da população; e teste de *Spearman* para a correlação não paramétrica entre carga viral e número de micronúcleos. Para a análise simples de prevalência, foi utilizado o programa *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) versão 20.0 para Macintosh. Para todas as análises estatísticas foi adotado como valor significativo o p menor que 0,05.

RESULTADOS E DISCUSSÃO
V. Resultados e Discussão**1 Análise da população estudada**

Neste estudo, a população foi composta, predominantemente, de sujeitos do gênero masculino. A presença de 01 (um) indivíduo do gênero feminino nos indivíduos que não utilizam medicação e 01 (um) indivíduo do gênero feminino no grupo de indivíduos que utilizam TDF ao invés de AZT é observado na Tabela 1.

Tabela 1. Prevalências de gênero e etnia por grupos de voluntários investigados.

Variáveis	Grupos	I		II		III		IV	
		n	%	n	%	n	%	n	%
Gênero									
Masculino		6,00	85,7	9,0	100,0	4,0	80,0	19,0	100,0
Feminino		1,00	14,3	0,0	0,0	1,0	20,0	0,0	0,0
Etnia									
Branco		0,0	0,0	1,0	11,1	5,0	100,0	6,0	31,6
Negro		0,0	0,0	8,0	88,9	0,0	0,0	4,0	21,1
Pardo		7,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	9,0	47,3
Total		7,0	100,0	9,0	100,0	5,0	100,0	19,0	100,0

Legenda: I: pacientes com HIV que não utilizam medicação; II: pacientes em uso de AZT+ 3TC+EFZ (zidovudina, lamivudina, efavirenz); III: pacientes em uso de TDF+3TC+EFZ (tenofovir, lamivudina, efavirenz); IV: pacientes sem HIV.

Estes componentes do sexo feminino correspondem a 14,3% e 20% nos seus grupos, respectivamente. Segundo Fenech e Bonassi (2011), um aumento no número de

micronúcleos é esperado no gênero feminino em relação ao masculino, devido a uma tendência das células perderem o cromossomo X, sendo este encontrado no citoplasma. Apesar disso, a população homogênea quanto ao gênero não se torna necessária em pesquisas com esta finalidade.

Ainda na TABELA 1, observa-se que a etnia predominante foi a parda, sendo o grupo composto pelos usuários do AZT o único formado pela maioria negra. Isso também não leva a interferências quanto à quantidade de micronúcleos e nada mais é do que reflexo da população do Nordeste do Brasil, que em sua maioria é parda.

Os personagens desta averiguação científica não possuíam diferenças significativas entre si quanto à idade, como observado na TABELA 2 (ANOVA, *Tukey* para múltiplas comparações $p = 0,65$). El-Zein, Vral e Etzel (2011) e Fenech e Benassi (2011) afirmam que o valor da frequência de micronúcleos aumenta com o avançar da idade, devido a vários fatores, dentre os quais, o acúmulo de mutações genéticas adquiridas durante os anos e, principalmente, devido a um estilo de vida pouco saudável

Tabela 2. Média, desvio padrão das idades e renda familiar por grupos de voluntários investigados.

Grupos	I	II	III	IV
	media desvio padrão	média desvio padrão	média desvio padrão	média desvio padrão
Variáveis				
Idade	32,29 ± 11,05 (23 – 56)	38,67 ± 8,24 (28-54)	36,80 ± 6,90 (28-44)	29,94 ±7,56 (21-45)
Renda familiar	1.466 ±960,5 (565-3500)	1.193,3 ±17098,4 (150-5650)	1.379 ±1283,0 (565-3500)	2.716,0 ±4216 (450,0- 19350)
Carga horaria semanal de trabalho	42,29 ± 14,02 (20-60)	141,67 ± 20,61 (0-60)	28,00 ± 26,83 (0-60)	35,47 ± 8,29 (20-44)

*Legenda: I: pacientes com HIV que não utilizam medicação; II : pacientes em uso de AZT+3TC+EFZ (zidovudina, lamivudina, efavirenz); III: pacientes em uso de TDF+3TC+EFZ (tenofovir, lamivudina, efavirenz) ; IV : pacientes sem HIV.

** idade, renda familiar e carga horaria semanal expressos em média desvio padrão, valores mínimos e máximos

Nesta investigação, apenas o grupo do Tenofovir, substituinte do AZT no esquema de terapia antirretroviral, foi composto exclusivamente por fumantes. Nos demais, temos o grupo formado por indivíduos com HIV que não utilizam medicação com uma porcentagem importante de fumantes (42,9%) e indivíduos com HIV e que fazem uso de esquema contendo AZT com 22,2% de fumantes. (Tabela 3).

Tabela 3. Hábitos de vida dos indivíduos distribuídos por grupos de voluntários investigados.

Variáveis	I		II		III		IV	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Fumo								
Sim	3,0	42,9	2,0	22,2	5,0	100,0	3,0	15,8
Não	4,0	51,9	7,0	77,9	0,0	0,0	16,0	84,2
Álcool								
Sim	4,0	51,9	3,0	42,9	4,0	80,0	11,0	
Não	3,0	42,9	6,0	51,9	1,0	20,0	57,9	
							8,0	42,1
Carne na dieta								
Sim	7,0	100,0	9,0	100,0	5,0	100,0	19,0	
Não	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	
							0,0	0,0
Vegetais na dieta								
Sim	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Não	7,0	100,0	9,0	100,0	5,0	100,0	19,0	
							100,0	

Total	7,0	100,0	9,0	100,0	5,0	100,0	19,0
							100,0

Legenda: I: pacientes com HIV que não utilizam medicação; II: pacientes em uso de AZT+3TC+EFZ (zidovudina, lamivudina, efavirenz); III: pacientes em uso de TDF+3TC+EFZ (tenofovir, lamivudina, efavirenz) ; IV : pacientes sem HIV.

Apesar de o cigarro ser um agente sabidamente cancerígeno, não há consenso quanto ao ato de fumar e a elevação de MN na maioria dos estudos. Embora estudos como os de Bansal *et al.*, 2012 apontem aumento da frequência de MN em células da mucosa oral, em uma análise definitiva de 5.710 indivíduos, sendo 3.501 não fumantes, 1.409 fumantes e 800 ex-fumantes não indicou diferenças significativas na frequência de MN tanto em MN de linfócitos quanto em MN de mucosa oral (BATTERSHILL; BURNETT; BULL, 2008; BENASSI-EVANS e FENECH, 2011; FENECH *et al.*, 2011). Por isso, o fato do grupo que faz uso do tenofovir ser todo ele composto por tabagistas não invalida o resultado deste estudo.

Hábitos como ingerir bebidas alcoólicas estão associados a aumento de micronúcleos, segundo (BENASSI-EVANS e FENECH, 2011). Como observado na TABELA 3, há um equilíbrio entre etilistas e não etilistas em todos os grupos, exceto no grupo que tem o tenofovir no seu esquema antirretroviral, em que 80% dos participantes são etilistas.

Um outro parâmetro avaliado foi a alimentação. Em estudo de Fenech e Benassi (2011), os alimentos são fatores importantes, pois é através dos alimentos que conseguimos micronutrientes essenciais para a síntese de DNA e de enzimas de reparo de danos mutagênicos. Os dados obtidos através da aplicação de questionário, nesta pesquisa, revelaram que 100% (cem por cento) dos indivíduos dos grupos estudados se alimentavam de carne ao invés de vegetais (Tabela 3). Segundo Solková *et al.* (2004) e Fenech (2010), como os vegetais são excelentes fontes de vitaminas e sais minerais, sua ausência na dieta pode gerar um desequilíbrio na homeostase celular e, portanto, contribuir para a instalação de uma patologia. Em relação ao tipo de trabalho, os voluntários deste estudo, estão distribuídos em vários e diferentes ambientes. Destaques para a forma autônoma, a sapataria e a lavoura. (Tabela 4).

Como o meio laboral responde por um número grande de horas de exposição à diversas substâncias, torna-se necessário o monitoramento constante da saúde dos trabalhadores que se expõem à substâncias químicas possivelmente tóxicas. Neste contexto, a lavoura e outros ambientes agrícolas têm sido objeto de investigações de vários pesquisadores abordando a relação da utilização de agrotóxicos e frequência de micronúcleos (Møller, Knudsen and Loft, 2000) (Pastor *et al.*, 2003). Também merece destaque o voluntário que trabalha como sapateiro (sapataria), no qual usa solventes à base de chumbo.

No mundo, a relação trabalho e saúde ainda se deflagra como um paradigma atual, sendo objeto de constantes reflexões e transformações. O modelo da Saúde do Trabalhador no Brasil permanece em construção, trazendo uma nova e ampliada perspectiva do processo de trabalho. No entanto, mesmo com todos os esforços existentes, ainda são alarmantes os registros de acidentes no trabalho e doenças relacionadas às atividades laborais no Brasil (TEIXEIRA e FERREIRA, 2012).

Tabela 4. Local de trabalho da população investigada distribuída por grupos de pacientes investigados.

Grupos/local de trabalho	Local de trabalho	
	n	%
I		
Escola	1,0	14,3
Lavoura	1,0	14,3
Autônomo	2,00	28,2
Restaurante	2,00	28,2
Loja de material de construção	1,00	14,3
II		
Sapataria	1,00	11,1
Não trabalha	1,00	11,1
Escola	1,00	11,1
Lavoura	1,00	11,1
Autônomo	3,00	33,3
Olaria	1,00	11,1
III		

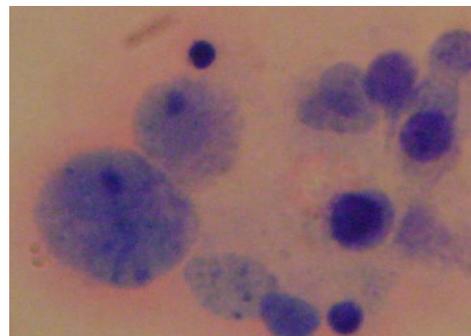
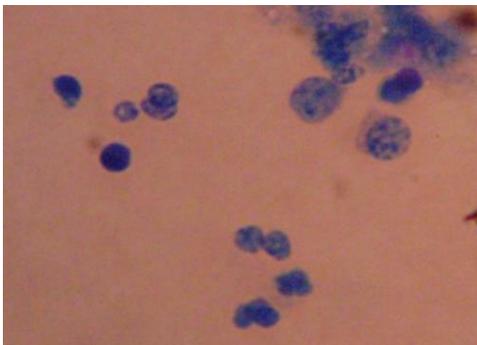
Não trabalha	2,00	40,0
Escola	1,00	20,0
lavoura	2,00	40,0
IV		
Administrativo	19,00	100,0

Legenda: I: pacientes com HIV que não utilizam medicação; II : pacientes em uso de AZT+ 3TC+EFZ (zidovudina, lamivudina, efavirenz); III: pacientes em uso de TDF+3TC+EFZ (tenofovir, lamivudina, efavirenz) ; IV : pacientes sem HIV.

2. Análises mutagênicas: frequências de micronúcleos em 2000 (duas mil) células binucleadas

Após a análise de MN em células binucleadas com bloqueio de citocinese através da citocalasina B (CBMN) (Figura 5), observou-se que os indivíduos com HIV soropositivos possuíam um aumento na frequência de MN em relação aos indivíduos sem HIV (Tabela 5).

Donahue e Wainberg (2013) afirmam em estudo que o HIV, por si só, promove mutações genéticas em indivíduos portadores deste vírus. Além disso, estudos epidemiológicos demonstram uma estreita relação entre câncer e indivíduos com AIDS (ALDAZ *et al.*, 2011; CLIFFORD *et al.*, 2012; WONG *et al.*, 2012). Portanto, como a frequência de MN reflete bem o risco do desenvolvimento de cânceres (FENECH, 2007; EL-ZEIN; VRAL; ETZEL, 2011; FENECH *et al.*, 2011; SUSPIRO e PRISTA, 2011) é perfeitamente compreensível a diferença significativa encontrada entre os dois grupos neste estudo.



A B
FIGURA 5: Fotomicrografias - Em A: padrão de células binucleadas observadas nas análises de micronúcleos (contagem em 2000 células/ aumento de 100X com óleo de imersão.) baseado no protocolo de (Fenech, 2007). Em B: Padrão da célula binucleada com micronúcleo encontrado.

Tabela 5. Comparação entre a frequência de micronúcleos encontradas nos pacientes com HIV (com e sem medicação) e nos voluntários sadios (controle).

Grupos	Frequência de Micronúcleos	Teste t Student
HIV (n = 21)	5,15 ± 2,22 (2,10 – 9,00)	P< 0,0001
Controle (n = 19)	0,54 ± 0,60 (0,00- 2,30)	

Contudo, é necessário se fazer uma observação: na TABELA 5 compoendo o grupo HIV estão incluídos todos os pacientes soropositivos, tanto os que estão em tratamento como os que não estão. Há assim, a necessidade de separar os pacientes soropositivos que não utilizam a medicação e pacientes soropositivos que utilizam a medicação para comparar com os indivíduos do grupo controle.

Após a análise de CBMN observou-se um aumento significativo na frequência de micronúcleos do grupo I (7 indivíduos soropositivos, porém virgens de tratamento) quando comparados com o grupo IV (19 indivíduos soronegativos) Os dados encontram-se distribuídos na Figura 6.

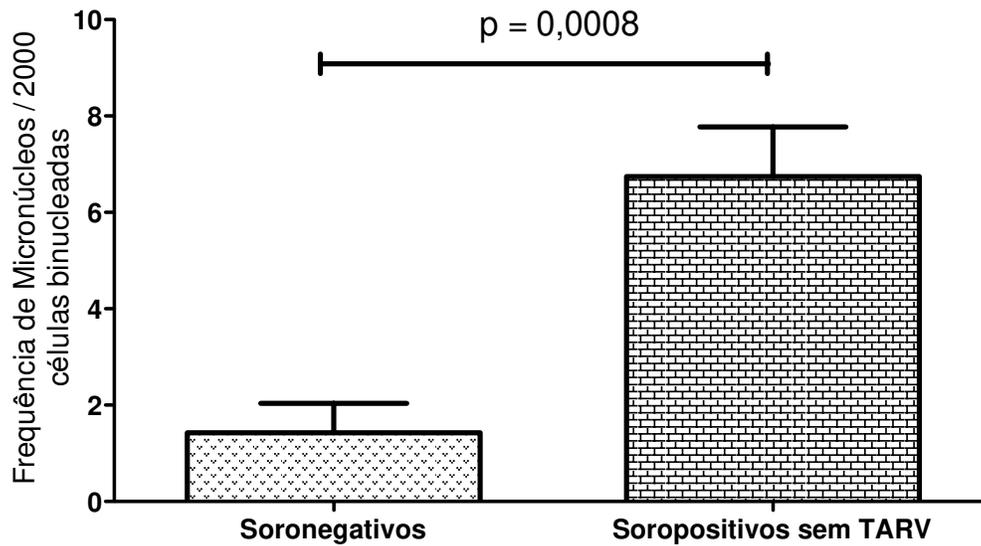


FIGURA 6: Diferença significativa encontrada na frequência de MN em indivíduos soropositivos sem medicação quando comparados com indivíduos soronegativos. Teste t de Student.

A presença do vírus HIV por si só parece elevar a frequência de micronúcleos de forma significativa.

Segundo Villa e Boccardo (2004), o HIV é um retrovírus que não carrega genes com capacidade oncogênica, mas é capaz de induzir a transformação celular pela integração do provírus na proximidade de proto-oncogenes celulares normais, alterando sua expressão e/ou atividade (ativação insercional).

Além disso, Afonso *et al.* (2007) afirmam que o HIV utiliza-se dos microtúbulos para direcionar o seu material genético através do citoplasma em direção ao núcleo como também para deslocar as proteínas virais sintetizadas no citoplasma e o RNA genômico do vírus até o local onde a encapsulação ocorre.

O centrossoma também parece ser o local subcelular em que as poliproteínas Gag do HIV-1 são sintetizadas e se ligam ao RNA genômico viral, iniciando assim encapsulação e montagem da partícula viral. Além disso, o centrossoma tem uma grande concentração local de chaperonas, que são essenciais na dobragem do Gag e posterior formação do capsídeo celular dos microtúbulos e sua localização perinuclear (AFONSO

et al., 2007).

Até então, vários grupos relataram a presença de múltiplos centrossomos e, por conseguinte aneuploidia, assim como micronúcleos em células que expressam Vpr, uma proteína oncogênica do HIV (AFONSO *et al.*, 2007). A Vpr parece induzir um deslocamento do polo Plk1/Plo1, um componente do centrossoma, que geralmente está localizado no corpo do fuso. O Plo1 é um regulador dos vários aspectos da divisão celular, incluindo a entrada em mitose, a montagem do fuso mitótico, maturação do centrossomo, a saída de mitose e a citocinese. Por isso, a sua dissociação do centrossomo leva a alterações de toda a função centrossomal. No entanto, não se pode excluir a possibilidade da poliploidia associada ao Vpr ser decorrente de alterações do ciclo celular induzida pelo vírus, resultando no desacoplamento dos ciclos centrossomal e nuclear. (AFONSO *et al.*, 2007).

Afonso *et al.* (2007) e Shimura *et al.* (1999) afirmam que, de fato, a infecção pelo HIV-1 dificulta a progressão do ciclo celular e as células infectadas acumulam anormalidades na fase G2 *in vitro* e acredita-se que a Vpr é considerada a principal determinante viral responsável por este bloqueio. Por análise mutacional, foi demonstrado que o domínio C-terminal da Vpr é responsáveis pela pausa do ciclo celular. Além disso verificou-se que a fosforilação da Vpr é necessária para esta função. Seguindo-se à expressão do Vpr, o acúmulo de células na fase G2 correlaciona-se com a inativação do fator promotor de mitose (FPM), que normalmente ocorre no centrossoma (Afonso *et al.*, 2007) Isso leva a formação de micronúcleos e aneuploidia, além de induzir a quebras cromossômicas e amplificação do gene (SHIMURA *et al.*, 1999).

A partir de um estudo realizado por Shimura *et al.* (1999) ficou comprovado que o Vpr é um agente mutagênico principalmente clastogênico, pois micronúcleos cinetócoro-positivos foram observados em apenas 10% dos induzidos por Vpr.

Todos estes fatores acima relatados culminam com a formação de micronúcleos em células parasitadas pelo HIV, o que justifica a maior frequência de micronúcleos no sangue periférico de indivíduos soropositivos do que nos indivíduos soronegativos.

A capacidade de induzir à formação de micronúcleos associado ao fato de o HIV diminuir a imunidade atuam em conjunto para a ocorrência de câncer em proporção elevada quando comparado a indivíduos soronegativos (WEINBERG,2008). Afinal, o sistema imune normal é responsável por reconhecer e eliminar células transformadas por vírus. Em indivíduos imunocomprometidos, essas células podem ser capazes de sobreviver indefinidamente (WEINBERG,2008).

Como o HIV colabora de forma direta no aumento da frequência de micronúcleos, seria razoável pensar que quanto maior a carga viral, maior a frequência de micronúcleos observada. Isso está exposto na Figura 7.

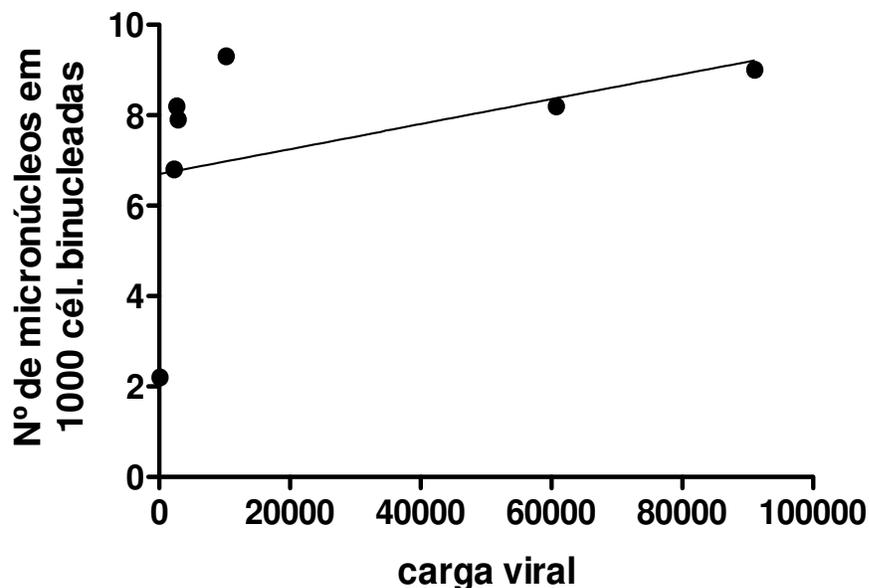


FIGURA 7: Diagrama de dispersão da carga viral versus o número de micronúcleos em 1000 células binucleadas. $p=0,0171$, Spearman= $0,818$.

Na Figura 7 observa-se a correlação entre número de micronúcleos em 1000 células binucleadas e a carga viral de cada paciente próximo ao dia da coleta da amostra. É evidente o aumento da quantidade de micronúcleos diretamente proporcional ao aumento da carga viral.

Estes dados parecem corroborar com o que foi relatado anteriormente. Se o

vírus HIV tem mesmo a capacidade de levar à formação de micronúcleos, quanto maior a carga viral, maior a quantidade de micronúcleos encontrados. No entanto, observa-se que três dos pacientes tem grande quantidade de micronúcleos, apesar de não terem carga viral tão alta. Os três tem em comum o fato de serem tabagistas de longa data. Além disso, um deles é sapateiro e trabalha com produtos químicos sem o uso do devido equipamento de proteção individual.

Quando se compara a quantidade de micronúcleos em células binucleadas dos indivíduos do grupo controle com aqueles em uso de algum tipo de esquema antirretroviral, fica evidente que os antirretrovirais elevam a quantidade de micronúcleos (Figura 8).

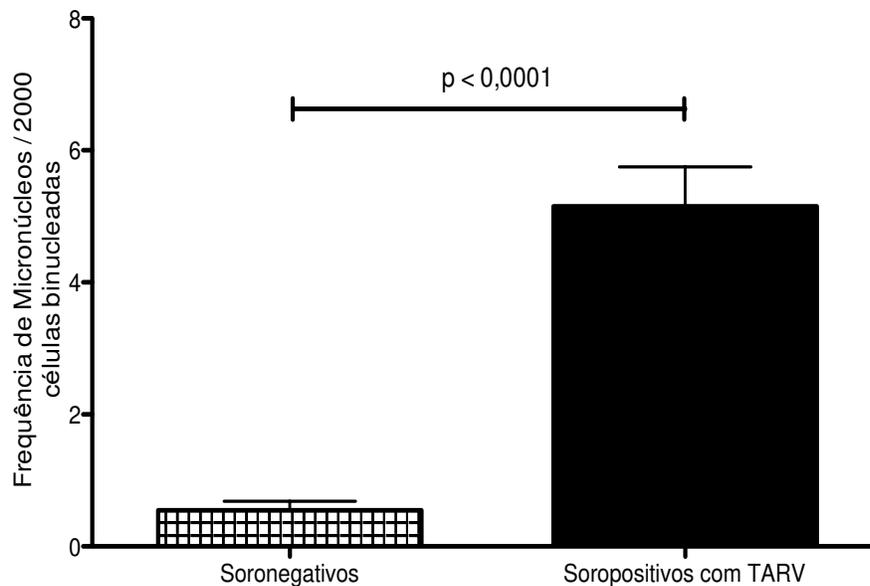


Figura 8: Diferença significativa encontrada na frequência de MN em indivíduos soropositivos com algum tipo de TARV quando comparados com indivíduos soronegativos. Teste t de Student.

Mesmo quando se avalia os esquemas em separado (comparação entre o grupo controle com o grupo em que se usa esquema com AZT e grupo controle com o grupo que usa esquema com TDF), a diferença na quantidade de micronúcleos é significativa. (Figuras 9 e 10).

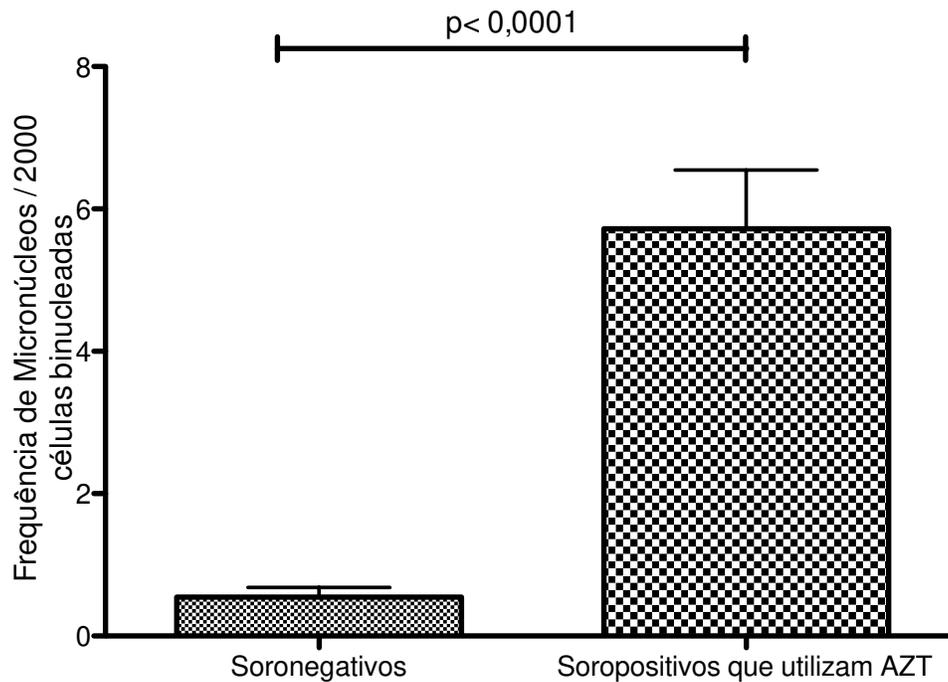


Figura 9: Diferença significativa encontrada na frequência de MN em indivíduos soropositivos que utilizam esquema contendo zidovudina (AZT) quando comparados com indivíduos soronegativos. Teste t de Student.

Apesar de haver evidências insuficientes em humanos para a carcinogenicidade da zidovudina, há evidências suficientes da carcinogenicidade deste medicamento em experimentos em animais. Por isso ela é considerada potencialmente carcinogênica em humanos (IARC,2000). Poucos estudos de carcinogenicidade foram realizados com os demais antirretrovirais.

A incorporação do AZT no DNA humano induz a mutações nos fosforribosiltransferase (Hprt) e timidina cinase (Tk) genes de hipoxantina-guanina. Além disso, o AZT também induz aberrações cromossômicas, troca de cromátides irmãs e encurtamento dos telômeros em células cultivadas (LOURENÇO *et al.*, 2010).

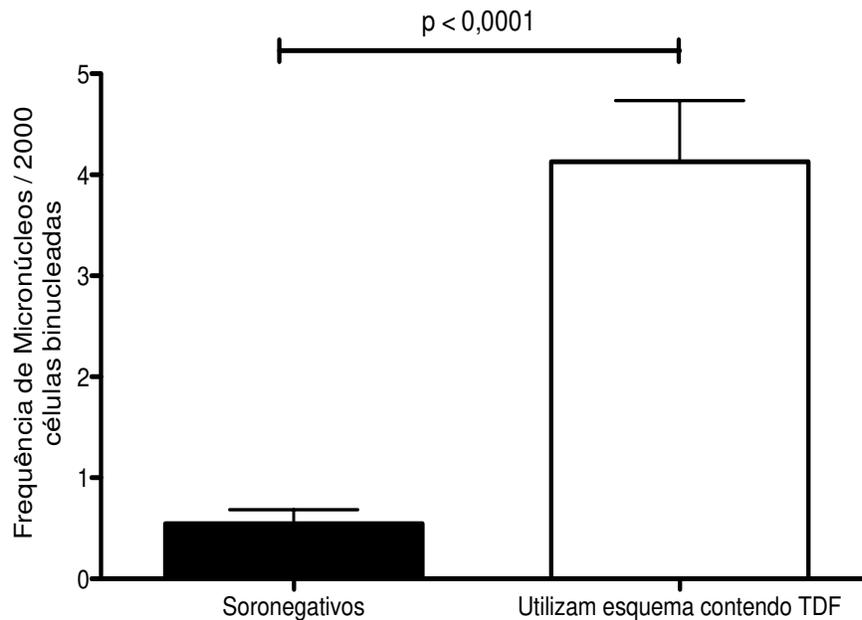


Figura 10: Diferença significativa encontrada na frequência de MN em indivíduos soropositivos que utilizam esquema contendo tenofovir (TDF) quando comparados com indivíduos soronegativos. Teste t de Student.

Na verdade, segundo Bayram e Topaktas (2008), a lamivudina foi recentemente classificada como um indutor fraco de troca de cromátides irmãs, aberrações cromossômicas e formação de micronúcleos em linfócitos periféricos humanos in vitro. Neste estudo, ela é utilizada nos três esquemas avaliados.

Além de aumentar a frequência de micronúcleos em células binucleadas, a estavudina (um inibidor da transcriptase reversa análogo de nucleotídeos) também afetou as células mononucleares, possivelmente causando perda cromossômica (LOURENÇO *et al.*, 2010).

No entanto, a estavudina não é genotóxico e não causa transformação celular in vitro, na maioria dos ensaios de rastreio de acordo com Lourenço *et al.*, 2010. Ela não faz parte de nenhum dos esquemas do presente estudo.

Estruturalmente, a principal diferença entre esses três inibidores da

transcriptase reversa análogos de nucleosídeos reside na posição 3' da 2'-deoxyribonucleoside, onde a zidovudina não tem um grupo azido, lamivudina tem um átomo de enxofre e a estavudina tem um grupo 2', 3', didesoxirribose insaturado. (Figura III)

Apesar das diferenças estruturais entre AZT e 3TC, que não havia desvios significativos nos seus efeitos clastogênicos, indicando que nem a azido nem o grupo enxofre interfere na genotoxicidade das drogas. A presença de 2', 3', didesoxirribose em vez do grupo azido ou um átomo de enxofre visto nas outras moléculas atribui uma nova propriedade aneugênica na estavudina só observada em células mononucleadas (LOURENÇO *et al.*, 2010).

Diferentemente do AZT, que já foi muito estudado quanto à sua capacidade de formação de micronúcleos *in vitro*, não há estudos *in vitro* publicados relacionando a formação de micronúcleos com o uso do tenofovir. Como o mecanismo de ação das duas drogas é similar (ambas são ITRN), acredita-se que a causa da formação de micronúcleos seja a mesma da induzida pelo AZT.

Muito embora a medicação antirretroviral seja essencial para a sobrevivência dos pacientes soropositivos para HIV, ela não traz impacto significativo quanto à proteção contra a formação de micronúcleos, como observado na Figura 11.

A Figura 12 evidencia que não há alteração significativa na quantidade de micronúcleo de células binucleadas entre os pacientes soropositivos sem terapia antirretroviral e o dos pacientes em uso de esquema contendo AZT.

Como colocado anteriormente, tanto o HIV quanto o AZT são potencialmente formadores de micronúcleos e não há dúvidas que os pacientes soropositivos se beneficiam sob o aspecto de qualidade de vida e prevenção de infecções e cânceres oportunistas quando em uso da TARV.

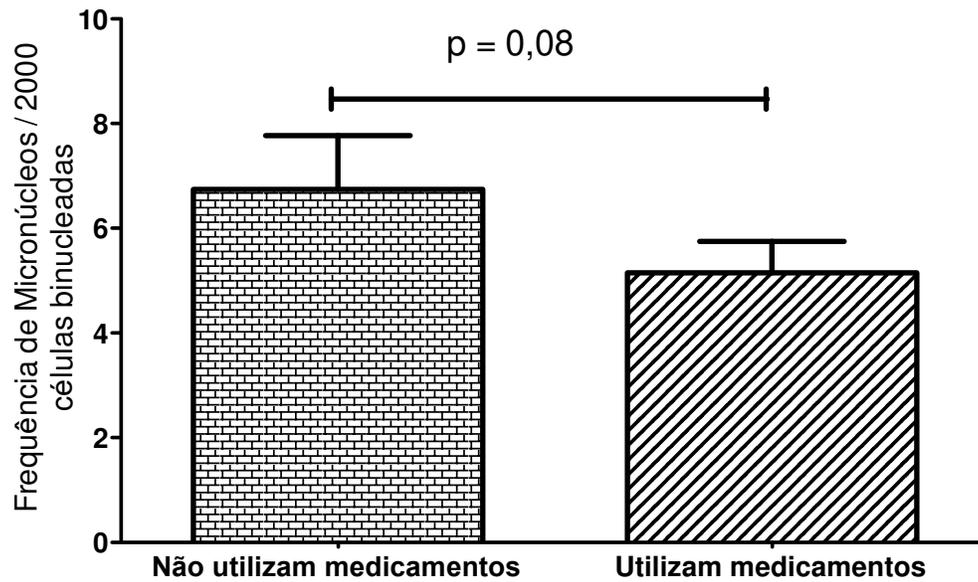


Figura 11: Diferença não significativa encontrada na frequência de MN em indivíduos soropositivos com algum tipo de terapia antirretroviral quando comparados com indivíduos soropositivos sem terapia antirretroviral. Teste t de Student.

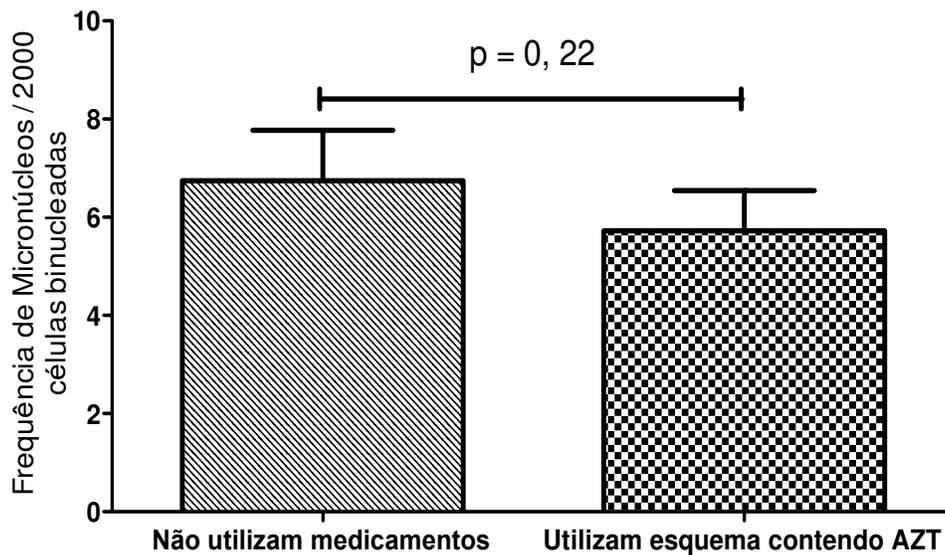


Figura 12: Diferença não significativa encontrada na frequência de MN em indivíduos soropositivos que utilizam esquema contendo zidovudina (AZT) quando comparados com indivíduos soropositivos sem terapia antirretroviral. Teste t de Student.

Na Figura 13 observa-se que não houve diferença significativa da frequência de micronúcleos em células binucleadas entre os indivíduos do grupo que faz uso de AZT e os do grupo que faz uso de TDF no esquema. Como referido anteriormente, as duas drogas têm um mesmo mecanismo de ação, o que pode justificar a similaridade dos dados nos dois grupos.

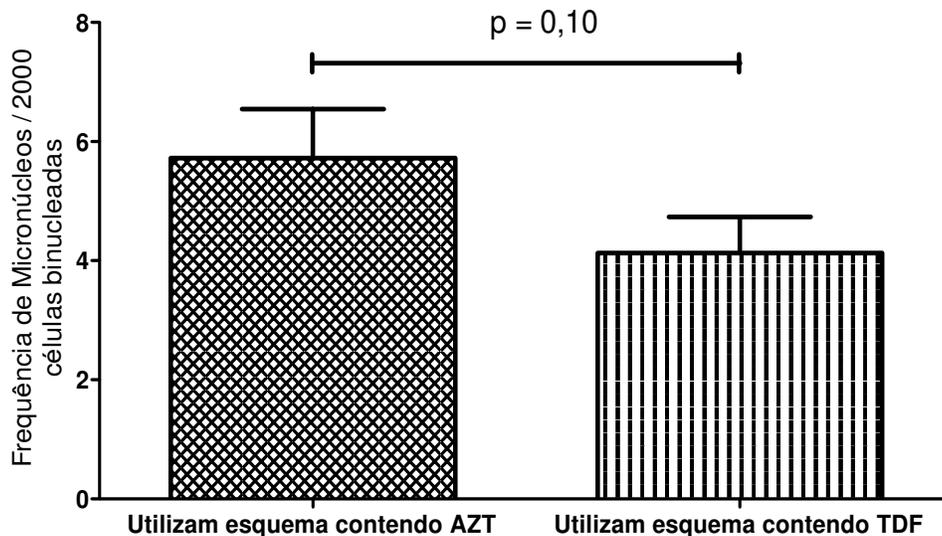


Figura 13: Diferença não significativa encontrada na frequência de MN em indivíduos soropositivos que utilizam esquema contendo tenofovir (TDF) quando comparados com indivíduos que utilizam esquema contendo zidovudina (AZT). Teste t de Student.

Na Figura 14 observa-se que houve diferença significativa da frequência de micronúcleos em células binucleadas entre os indivíduos soropositivos que não fazem uso de TARV e os indivíduos que fazem uso do TDF no esquema.

Como já citado, não há estudos de frequência de micronúcleos in vivo ou in vitro envolvendo o TDF. Apesar de ser do mesmo grupo de TARV do AZT (ITRN), ele parece ser mais seguro quanto à formação de micronúcleos quando comparado com indivíduos soropositivos que ainda não fazem uso de TARV. Há a necessidade de estudos mais aprofundados, com uma amostra maior, para confirmar ou refutar esta observação.

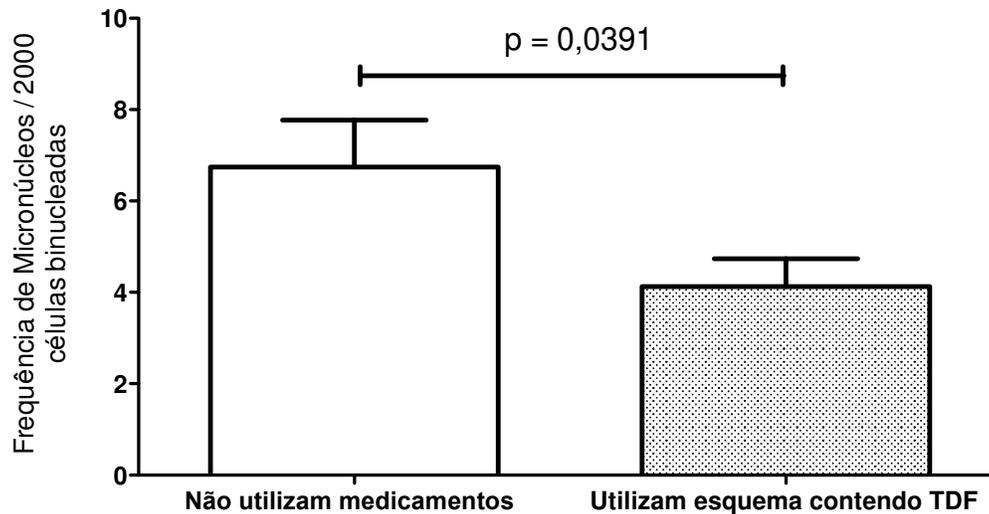


Figura 14: Diferença significativa encontrada na frequência de MN em indivíduos soropositivos que utilizam esquema contendo tenofovir (TDF) quando comparados com indivíduos soropositivos que não fazem uso de TARV. Teste t de Student.

A Figura 15 mostra que, a quantidade de micronúcleos formada em pacientes soropositivos que fazem uso de TARV contendo AZT e que são etilistas não tem aumento significativo quando comparado com a quantidade de micronúcleos em pacientes soropositivos que fazem uso de TARV contendo AZT e não são etilistas.

Em estudo feito por Benassi-Evans e Fenech (2011), a hipótese de que a exposição crônica ao álcool induz à formação de micronúcleos em células de linhagem linfoblástica humana foi confirmada. O álcool tem a capacidade de induzir a vários eventos de danos genoma, tais como a perda do cromossoma e a ruptura, o rearranjo dos cromossomas e a amplificação do gene. Além disso, a exposição crônica ao álcool induz a aneuploidia. Em outro trabalho feito por Zamora-Perez *et al.* (2013) a exposição da mucosa oral a substâncias contendo álcool também exibiram um aumento de MN nas células da mucosa bucal.

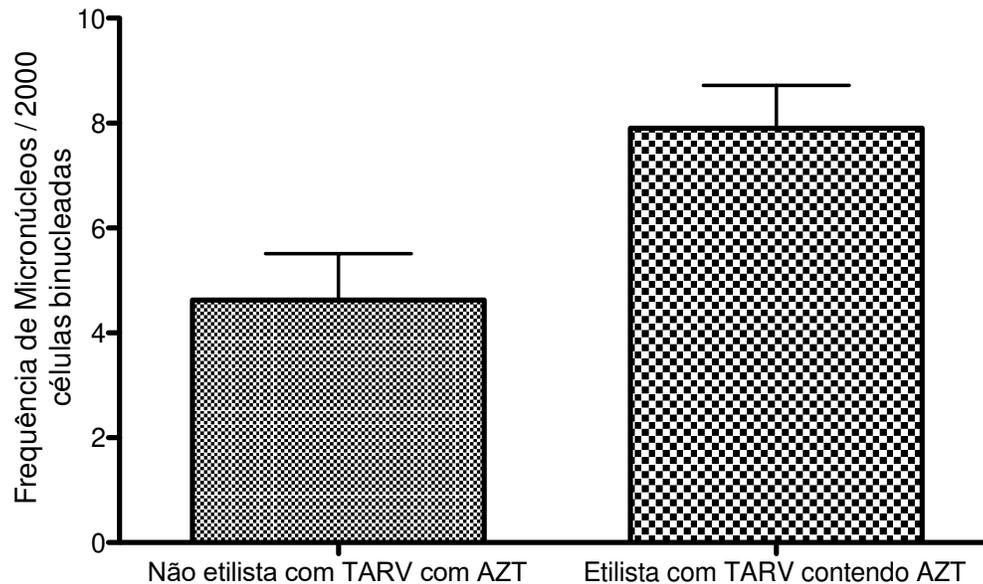


Figura 15: Diferença não significativa encontrada na frequência de MN em indivíduos soropositivos etilistas que utilizam esquema contendo zidovudina (AZT) quando comparados com indivíduos não etilistas que utilizam esquema contendo zidovudina (AZT), $p=0,65$ Teste t de Student.

Não há artigos publicados que evidenciem a relação da associação de AZT e álcool com a formação de micronúcleos. Todavia, sabe-se que o efeito deletério do uso crônico de álcool pode prejudicar o tratamento antirretroviral por diminuir a concentração da medicação e aumentar a possibilidade de resistência do vírus a este medicamento. (COSTA, 2013)

Na Figura 16 observa-se que a quantidade de micronúcleos formada em pacientes soropositivos que não fazem uso de TARV e que são etilistas é até menor quando comparado com a quantidade de micronúcleos em pacientes soropositivos que não fazem uso de TARV e não são etilistas. No entanto, a diferença entre os dois grupos é insignificante.

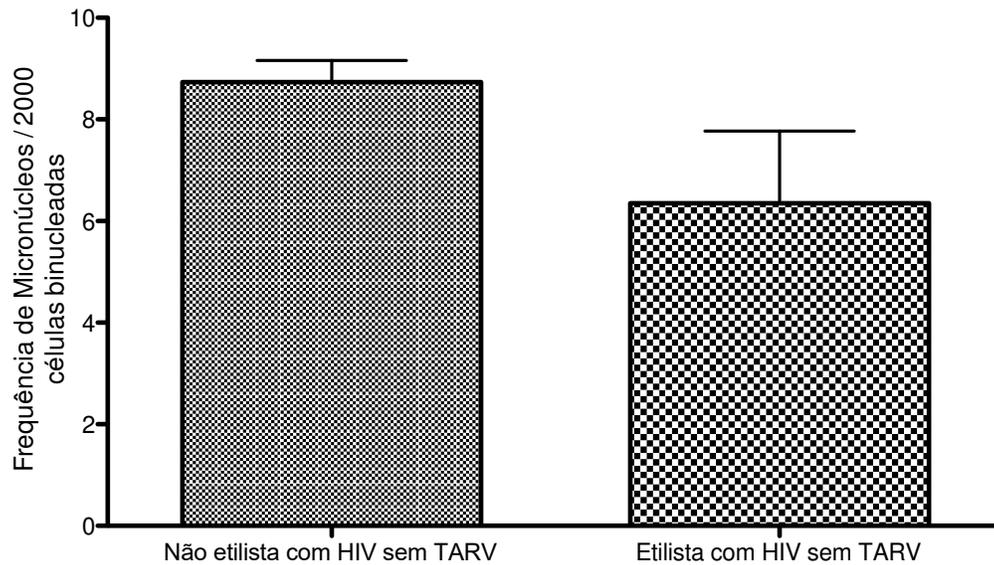


Figura 16: Diferença não significativa encontrada na frequência de MN em indivíduos soropositivos etilistas sem terapia antirretroviral quando comparados com indivíduos soropositivos não etilistas sem terapia antirretroviral, $p=0,12$ Teste t de Student.

Também não há artigos publicados que evidenciem a associação de HIV e álcool com a formação de micronúcleos. Porém, estão bem documentados que ambos os agentes, quando independentes, elevam a frequência de micronúcleos, como relatado anteriormente. No entanto, o álcool em uso crônico, por ser deletério mesmo no organismo saudável, também é prejudicial em indivíduos com doença crônica, como nos portadores de HIV (COSTA, 2013).

VI. Conclusão

O HIV, como muitos retrovírus, tem a sua presença muito vinculada à ocorrência de câncer. Embora a imunodeficiência associada ao vírus seja uma das principais responsáveis por isso, fica claro neste estudo que a presença deste vírus em humanos leva ao aumento de micronúcleos, o que pode colaborar para a elevação dos casos de câncer em pacientes soropositivos. A TARV contendo AZT trouxe benefícios perceptíveis quanto à sobrevivência e qualidade de vida aos indivíduos soropositivos e o aumento de micronúcleos em células binucleadas observados neste estudo não foi significativo quando comparado ao causado pelo HIV em paciente sem uso destas medicações. Por outro lado, a partir do que foi observado neste estudo, o esquema com tenofovir, por levar a uma produção significativamente menor de micronúcleos, parece ser o mais vantajoso apresentando vantagem inclusive em relação a indivíduos soropositivos que não fazem uso de terapia antirretroviral. Por fim, apesar dos efeitos deletérios que a ingestão de álcool pode causar, não houve aumento de micronúcleo de forma significativa em pacientes em uso de bebidas alcoólicas, sendo eles soropositivos em uso de TARV ou soropositivos e ainda com carga viral presente, sem uso de TARV.

VII. Recomendações

- Embora a indução à formação de micronúcleos por parte do próprio HIV e/ou do AZT estejam bem documentados a partir de estudos *in vitro*, há a carência de estudos *in vivo*, com amostras maiores para melhor documentação deste fato. Quanto ao TDF, não há estudos voltados para a indução à formação de micronúcleo por este medicamento, nem mesmo *in vitro*.

- Apesar das elevadas frequências de micronúcleos encontradas tanto em pacientes que usam AZT quanto em pacientes que usam TDF, recomenda-se a continuidade do uso destas medicações como controle para a infecção pelo HIV. Ressalta-se que o vírus HIV é um potencial indutor à formação de micronúcleos. Portanto, manter a carga viral elevada pode, além de levar a cânceres oportunistas, levar ao surgimento de infecções oportunistas graves ou mesmo fatais. A única forma de controle continua sendo a TARV, mesmo também sendo indutora do aumento da frequência de micronúcleos.

VIII. Bibliografia

AFONSO, P.V.; ZAMBORLINI, A.; SAIB A.; MAHIEUX R. Centrosome and retroviruses: the dangerous liaisons. **Retrovirology**, v. 4, p. 27, jan. 2007.

ALDAZ, P.; MORENO-IRIBAS, C.; EGUÉS, N.; IRISARRI, F.; FLORISTA, Y.; SOLA-BONETA, J.; MARTÍNEZ-ARTOLA, V.; SAGREDO, M.; CASTILLA, J. Mortality by causes in HIV-infected adults: comparison with the general population. **BMC Public Health**, v. 11, p. 300, jan. 2011.

APOR, M.I.J.Z.; OZZA, K.E.L.C. **Med-Psych Drug-Drug Interactions Update Antiretrovirals, Part II: Focus on Non-Protease Inhibitor Antiretrovirals (NRTIs, NNRTIs, and Fusion Inhibitors)**. December, 2004.

AYERS, K.M.; CLIVE, D.; TUCKER JÚNIOR, W.E.; HAJIAN, G.; MIRANDA, J. Nonclinical toxicology studies with zidovudine: genetic toxicity tests and carcinogenicity bioassays in mice and rats. **Fundamental and Applied Toxicology : Official Journal of the Society of Toxicology**, v. 32, n. 2, p. 148–158, ago. 1996.

BANSAL, H.; SANDHU, V.S.; BAHANDARI, R.; SHARMA, D. Evaluation of micronuclei in tobacco users: A study in Punjabi population. **Contemporary Clinical Dentistry**, v. 3, n. 2, p. 184–187, abr. 2012.

BATTERSHILL, J.M.; BURNETT, K.; BULL, S. Factors affecting the incidence of genotoxicity biomarkers in peripheral blood lymphocytes: impact on design of biomonitoring studies. **Mutagenesis**, v. 23, n. 6, p. 423–37, nov. 2008.

BAYRAM, S.; TOPAKTAS, M. Confirmation of the chromosome damaging effects of lamivudine in *in vitro* human peripheral blood lymphocytes. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 49, p. 328-33, jul. 2007.

BENASSI-EVANS, B.; FENECH, M. Chronic alcohol exposure induces genome damage measured using the cytokinesis-block micronucleus cytome assay and aneuploidy in human B lymphoblastoid cell lines. **Mutagenesis**, v. 26, n. 3, p. 421–9, maio. 2011.

BRITO, M. A. Fármacos recentes usados para o tratamento da infecção pelo HIV-1:

enfuvirtida, maraviroc, raltegravir e etravirina. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n.2, p. 159-68, abr. 2011.

CAVALLO, D.; URSINI, C.L.; OMODEO-SALÈ, E.; IAVICOLI, S. Micronucleus induction and FISH analysis in buccal cells and lymphocytes of nurses administering antineoplastic drugs. **Mutation Research**, v. 628, n. 1, p. 11–8, 30 mar. 2007.

CLIFFORD, G.M.; LISE, M.; FRANCESCHI, S.; EGGER, M.; BOUCHARDY, C.; KAROL, D.; LEVI, F.; ESS, S.; JUNDT, G.; WANDELER, G.; FEHR, J.; SCHMID, P.; BATTEGAY, M.; BERNASCONI, E.; CAVASSINI, M.; CALMY, A.; KEISER, O.; SCHONI-AFFOLTER, F. Lung cancer in the Swiss HIV Cohort Study: role of smoking, immunodeficiency and pulmonary infection. **British Journal of Cancer**, v. 106, n. 3, p. 447–52, jan. 2012.

COSTA, A. R. **PROTOCOLO CLÍNICO E DIRETRIZES TERAPÊUTICAS PARA ADULTOS VIVENDO COM HIV / AIDS**. p. 1–75, 2013.

COTÉ, T. R.; BIGGARD, R. S. Does zidovudine cause non-Hodgkin's lymphoma? **Aids**, v.9, n. 4, p. 404-5, 1995.

DONAHUE, D. A.; WAINBERG, M. A. Cellular and molecular mechanisms involved in the establishment of HIV-1 latency. **Retrovirology**, v. 10, n. 1, p. 11, 2013.

EL-ZEIN, R.; VRAL, A.; ETZEL, C. J. Cytokinesis-blocked micronucleus assay and cancer risk assessment. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 101–6, jan. 2011.

FENECH, M. Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer. **Drug Discovery Today**, v. 7, n. 22, p. 1128–37, 15 nov. 2002.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**, v. 2, n. 5, p. 1084–104, jan. 2007.

FENECH, M.; HOLLAND, N.; ZEIGER, E.; CHANG, W.P.; BURGAS, S.; THOMAS, P.; BOLOGNESI, C.; KNASMUELLER, S.; KIRSCH-VOLDER, M.; BONASSI, S. The HUMN and HUMNxL international collaboration projects on human micronucleus assays in lymphocytes and buccal cells--past, present and future. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 239–45, jan. 2011.

FENECH, M.; BONASSI, S. The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes.

Mutagenesis, v. 26, n. 1, p. 43–9, jan. 2011.

FENECH, M. F. Dietary reference values of individual micronutrients and nutriomes for genome damage prevention : current status and a road map to the. v. 91, p. 1438–1454, 2010.

FLEXNER, C. Agentes antirretrovirais e tratamento da infecção pelo HIV. In: BRUNTON, L. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**. 12.ed. Porto Alegre: Artmed. cap. 59. p. 1623-63.

GISSELSSON, D.; BJORK, J.; HOGLUND, M.; MERTENS, F.; CIN, P.D.; AKERMAN, M.; MANDAHL, N. **Abnormal nuclear shape in solid tumors reflects mitotic instability**. *The American journal of pathology*, jan. 2001. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1850274&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**. v. 76. Lyon, 2000.

KING, J.R.; KIMBERLIN, D.W.; ALDROVANDI, G.M.; ACOSTA, E.P. Antiretroviral pharmacokinetics. **Clinical Pharmacokinetic**, v. 41, n. 14, p. 1115-33, dez. 2002.

LEVINE, A.M.; BERNSTEIN, L.; SULLIVAN-HALLEY, J.; SHIBATA, D.; MAHTERIAN, S.B.; NATHWANI, B.N. Role of zidovudine antiretroviral therapy in the pathogenesis of acquired immunodeficiency syndrome-related lymphoma. **Blood**, v. 86, n. 12, p. 4612–6, 15 dez. 1995.

LOMAR, A.V.; BAZIN, A.R.; RAMOS FILHO, C.F.; AGUIAR, J.I.A.; AZEVEDO, K.M.L.; SILVA, M.A.M.; PEDRO, R.J.; TAVARES, W. Aids. In: TAVARES, W.; MARINHO, L. A. C. **Rotinas de diagnóstico e tratamento em doenças infecciosas e parasitárias**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2007. cap. 5. p. 38-87.

LOURENÇO, E.D.; AMARAL, V.S.; LEHMANN, M.; DIHL, R.R.; SCHMITT, V.M.; CUNHA, K.S.; REGULY, M.L.; ANDRADE, H.H.R. Micronuclei induced by reverse transcriptase inhibitors in mononucleated and binucleated cells as assessed by the cytokinesis-block micronucleus assay. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, n. 4, p. 756–60, out. 2010.

MENG, Q.; SU, T.; OLIVERO, O.A.; POIRIER, M.C.; SHI, X.; DING, X.; WALKER, V.E. Relationships between DNA incorporation, mutant frequency, and loss of heterozygosity at the TK locus in human lymphoblastoid cells exposed to 3'-azido-3'-deoxythymidine.

Toxicological sciences : an Official Journal of the Society of Toxicology, v. 54, n. 2, p. 322–9, abr. 2000.

MØLLER, P.; KNUDSEN, L. E.; LOFT, S. The Comet Assay as a Rapid Test in Biomonitoring Occupational Exposure to DNA-damaging Agents and Effect of Confounding Factors. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**. p. 1005–1015, 2000.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. Retrovírus. In: ____ **Microbiologia médica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. cap. 65. p. 641-657.

NORPPA, H. **What do human micronuclei contain? Mutagenesis**, 1 maio. 2003. Disponível em: <<http://www.mutage.oupjournals.org/cgi/doi/10.1093/mutage/18.3.221>>

NUNNARI, G.; SMITH, J.A; DANIEL, R. HIV-1 Tat and AIDS-associated cancer: targeting the cellular anti-cancer barrier? **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR**, v. 27, p. 3, jan. 2008.

OLIVERO, O. A.; YUSPA, S.H.; POIRIER, M.C.. Transplacental Effects of 3'-Azido-2',3' Dideoxythymidine (AZT): Tumorigenicity in Mice and Genotoxicity in Mice and Monkeys. **Journal of the National Cancer Institute**. v. 89, n. 21, 1997.

PASTOR, S.; CREUS, A.; PARRÓN, T.; CEBULSKA-WASILEWSKA, A.; SIFFEL, C.; PIPERAKYS, S.; MARCOS, R.. Biomonitoring of four European populations occupationally exposed to pesticides : use of micronuclei as biomarkers. **Mutagenesis**. v. 18, n. 3, p. 249–258, 2003.

PEDERSEN-BJERGAARD, J. CHRISTIANSEN, D.H.; ANDERSEN, M.K.; SKOVBY, F. Causality of myelodysplasia and acute myeloid leukemia and their genetic abnormalities. **Leukemia**, v. 16, n. 11, p. 2177–84, nov. 2002.

RIBEIRO, A.F.; VERAS, M.A.S.M.; GUERRA, M.A. T. Infecção por HIV e Aids: epidemiologia. In: FOCACCIA, R. **Tratado de infectologia**. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 2009. cap. 8. p. 137-156.

SABINO, E. C.; BARRETO, C. C.; SANABANI, S. S. Infecção por HIV e Aids: etiologia e subtipos do HIV. In: FOCACCIA, R. **Tratado de infectologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2009. cap. 8. p. 131-137.

SHIMURA, M.; ONOZUKA, Y.; YAMAGUCHI, T.; HATAKE, K.; TAKAKU, F.; ISHIZAKA,

Y. Advances in Brief Micronuclei Formation with Chromosome Breaks and Gene Amplification Caused by Vpr, an Accessory Gene of Human Immunodeficiency Virus. **Cancer Research**. v. 1. n. 9, p. 2259–2264, 1999.

SMOLKOVÁ, B. DUZINSKÁ, M.; RASLOVÁ, K.; BARACONKOVÁ, M.; KAZIMIROVÁ, A.; HORSKÁ, A.; SPUSTOVÁ, V.; COLLINS, A. Folate levels determine effect of antioxidant supplementation on micronuclei in subjects with cardiovascular risk. **Mutagenesis**, v. 19, n. 6, p. 469–76, nov. 2004.

SUSPIRO, A.; PRISTA, J. Biomarkers of occupational exposure do anticancer agents: a minireview. **Toxicology Letters**, v. 207, n. 1, p. 42–52, 10 nov. 2011.

TEIXEIRA, P. S.; FERREIRA, M. B. Acidentes com material biológico entre os profissionais de saúde : revisão. **Perquirere**, v. 9, n. 2, p. 44–53, dez. 2012.

United States of America. National Institutes of Health. U. S. Department of Health and Human Services. NTP technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of AZT (cas no. 30516-87-1) and AZT^o-interferon A/D in B6V3F mice 1 (gavage studies), 1999.

VILLA, L. L.; BOCCARDO, E. Vírus e câncer. In: FERREIRA, C. G.; ROCHA, J. C. **Oncologia Molecular**. 1.ed. São Paulo: Atheneu, 2004. cap. 12. p. 123-132.

WEINBERG, R. A. Controle populacional: imunologia tumoral e imunoterapia. In: _____ **A Biologia do Câncer**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. cap. 15. p. 655-724.

WONG, E. B.; OMAR, T.; SETLHAKO, G.J.; OSIH, R.; FELDMAN, C.; MURDOCH, D.M.; MARTINSON, N.A.; BANGSBERG, D.R.; VENTER, W.D.F. Causes of death on antiretroviral therapy: a post-mortem study from South Africa. **PloS one**, v. 7, n. 10, p. e47542, jan. 2012.

ZAMORA-PEREZ, A. L.; MARIAUD-SCHIMIDT, R.P.; FUENTES-LERMA, M.G.; GUERRERO-VELÁZQUEZ, C.; GÓMEZ-MEDA, B.C.; LÓPEZ-VERDÍN, S.; ZUÑIGA-GONZÁLES, G.M. Increased number of micronuclei and nuclear anomalies in buccal mucosa cells from people exposed to alcohol-containing mouthwash. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 36, n. 2, p. 255–60, abr. 2013.

APÊNDICES

APÊNDICE I

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Você está sendo convidado a participar de um projeto de pesquisa. Sua participação é importante, porém você não deve participar contra sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar para que todas as dúvidas sobre a pesquisa sejam esclarecidas.

O corpo humano é composto por células. No interior de cada célula existe o DNA, molécula que carrega milhares de informações de como a célula deve funcionar para manter o nosso organismo em ordem. Quando o DNA de uma célula é alterado, ela pode deixar de funcionar adequadamente e passar a se multiplicar de maneira descontrolada e levar a doenças. Algumas substâncias podem alterar o DNA das células do homem e facilitar o desenvolvimento de doenças. Por isso é importante e necessária a avaliação dessas substâncias quanto aos possíveis efeitos ruins que elas podem causar ao DNA.

Esta pesquisa quer avaliar a capacidade da zidovudina, medicamento utilizado no tratamento da Aids, em alterar o DNA nas células do sangue. Para tanto vamos colher 05 mL de seu sangue para realizar exames necessários para se ter um diagnóstico.

Estudo desse tipo poderá contribuir para o conhecimento dos efeitos desse medicamento que comumente faz parte do esquema de tratamento da Aids, quanto à possibilidade de alterar o DNA das células do ser humano. Essa pesquisa se baseia em estudo experimental em que os benefícios aos voluntários serão de forma indireta, ao se verificar a capacidade da zidovudina em alterar o DNA das células.

Para a realização da pesquisa, necessitamos de sua colaboração voluntária. Você ajudaria nosso estudo doando 05 mL de sangue, que serão coletados no Laboratório de Central do Estado do Piauí, por pessoal devidamente treinado e habilitado. A retirada de sangue é um procedimento seguro e pode causar um leve desconforto. Pode ocorrer uma mancha roxa no local da picada da agulha que, normalmente, desaparece logo. Esta coleta terá como objetivo a obtenção dos linfócitos (células do sangue) humanos, a partir do sangue total. Também, será necessário responder as perguntas feitas em entrevista.

Para ser voluntário é condição indispensável que seja soropositivo (tenha o vírus HIV), porém sem sinais ou sintomas de Aids, que esteja em acompanhamento ambulatorial no Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella.

A pesquisa será desenvolvida pela médica infectologista Elna Joelane Lopes da Silva do Amaral, aluna do mestrado em Farmacologia, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará.

O material colhido será usado exclusivamente para a execução desta pesquisa, e os dados obtidos serão encaminhados para publicação em revistas especializadas e congressos. Garantimos que em nenhum momento você será identificado, exceto pelos responsáveis pelo estudo, e que as informações só serão divulgadas entre os profissionais estudiosos do assunto. A qualquer momento você poderá solicitar informações sobre a pesquisa e também a qualquer momento pode se recusar a participar do estudo e retirar o seu consentimento, sem que isso lhe traga qualquer penalidade ou prejuízo

Endereço da responsável pela pesquisa:

Residencial : Rua Miosótis nº 1135 Edifício Strauss Apt 202 bairro Jóquei Telefone: (86) 32325232

Endereço Profissional

Instituição: Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella.

Endereço : Rua Governador Raimundo Artur e Vasconcelos, Nº 151,
Bairro: Centro-Sul. CEP: 64001-450. Teresina-PI

Telefones p/contato: (86) 3232-5232/ 8818-5232.

ATENÇÃO: Para informar ocorrências irregulares ou danosas durante a sua participação no estudo, dirija-se ao:

Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará

Rua Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo

Telefone: (85) 3366.8338

DECLARAÇÃO DO PARTICIPANTE OU DO RESPONSÁVEL PELO PARTICIPANTE:

Tendo compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado sobre a minha participação no mencionado estudo e estando consciente dos meus direitos, das

minhas responsabilidades, dos riscos e dos benefícios que a minha participação implicam, concordo em dele participar e para isso eu DOU O MEU CONSENTIMENTO, SEM QUE PARA ISSO EU TENHA SIDO FORÇADO OU OBRIGADO.

Teresina,

Assinatura ou impressão datiloscópica do voluntário ou responsável legal	Nome e Assinatura do responsável pelo estudo
	Nome do profissional que aplicou o TCLE
<p>Endereço do participante-voluntário Domicílio: (rua, praça, conjunto): Bloco: /Nº: /Complemento: Bairro: /CEP/Cidade: /Telefone: Ponto de referência:</p>	

APÊNDICE II

QUESTIONÁRIO DE SAÚDE PESSOAL

De acordo com modelo recomendado por: International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens (ICPEMC) Mutation Research, 204:379-406, 1988.

Este questionário, assim como o estudo a ele relacionado, devem ser de seu interesse. A participação é espontânea e constará destas informações gerais sobre sua saúde e dieta, mais uma coleta de material para estudo das células do seu sangue. O estudo consiste em uma avaliação de modificações nas células de cada participante. Estas modificações podem ocorrer normalmente nas células de todas as pessoas em nível bastante baixo, e são apontadas, entre outros efeitos, nos processos de envelhecimento e do câncer.

Leia e responda cuidadosamente as seguintes questões. A informação dada por você não será associada com o seu nome, sendo conhecida apenas pelos pesquisadores associados a este estudo. As respostas deste questionário poderão ter influência direta na interpretação de nossos resultados. Por isso, contamos com sua cooperação em fornecer informações corretas.

Obrigado pelo seu interesse.

1. Nome -----

2. Para ser preenchido pelo pesquisador: Código nº: -----

Data: -----

Essa folha será destacada das demais do questionário e arquivada. Apenas o número do código será usado como identificação nas próximas páginas. Se espaço adicional for necessário para completar uma resposta, por favor, escreva atrás da página e identifique o complemento da resposta com o número da questão.

HISTÓRIA PESSOAL

3. Data de hoje: -----/-----/-----
4. Qual a sua idade?(em anos)
5. Sexo: () Masculino () Feminino
6. A qual grupo étnico você pertence:
 () Branco () Pardo () Negro () Amarelo
 () Indígena. () Outro. Qual?-----
7. Qual o seu estado civil?
 () Casado () Solteiro () Separado () Divorciado () Viúvo ()
8. De quantos filhos você é pai natural (isto é, não inclua filhos adotados e de criação, e inclua filhos que moram separadamente)? -----
9. Qual é a renda mensal de sua família?----- Salários

HISTÓRIA OCUPACIONAL

10. Qual o seu local de trabalho?

11. Há quanto tempo você trabalha neste local?

12. Se há menos de dez anos, onde você trabalhou previamente e por quanto tempo?----

13. a) Que tipo de trabalho você faz? -----

13. b) Qual é a carga horária semanal de trabalho?-----

EXPOSIÇÃO

14. a) Liste os agentes químicos (por exemplo, gases tóxicos, benzeno, chumbo, Fármacos, agrotóxicos, etc.) ou físicos (radiação) a que você se expôs nos últimos 10 anos:

Nos últimos 10 anos: **Quantas vezes por mês** **Nos últimos 12 meses**

14. b) Você usa algum tipo de proteção?----- () Sim () Não

HISTÓRIA DE FUMO

15. Alguma vez você fumou? () Sim () Não

Se não, passe para a questão 16. Se sim, continue:

a) - Quanto tempo você fumou ? ----- (em anos)

b) - Quando você parou de fumar ?----- (mês e ano)

c) – O que você fumava no passado? () Cigarros

() Charutos

() Cachimbo

g) – Você mastiga tabaco? () Sim () Não

FICHA DE SAÚDE CÓD. nº:----- Página 2

MEDICAMENTOS E DOENÇAS

16. Você faz uso de medicação contra o vírus HIV no momento? () Sim () Não

Se não, passe para a questão 17. Se sim, continue:

a) Cite as medicações contra o vírus HIV já utilizadas e o período de uso:

Esquema	Esquema	Esquema	Esquema
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
Período	Período	Período	Período
Início ___/___/___	Início ___/___/___	Início ___/___/___	Início ___/___/___
Final ___/___/___	Final ___/___/___	Final ___/___/___	Final ___/___/___

17. Você fez uso de alguma medicação no último ano (por exemplo, anti-hipertensivos, hipoglicemiantes, insulina, tranqüilizantes, relaxantes musculares, analgésicos antiácidos, anti-histamínicos, sedativos, vitaminas, etc.)? () Sim () Não

Se sim, por favor, indique:

Medicamento	Dose	Início	Término
18. _____	lg _____	___/___/___	___/___/___
_____	_____	___/___/___	___/___/___
Câb _____	_____	___/___/___	___/___/___
_____	_____	___/___/___	___/___/___
_____	_____	___/___/___	___/___/___

- Hepatite () Sim () Não
- Mononucleose () Sim () Não
- Herpes () Sim () Não
- AIDS () Sim () Não
- Meningite () Sim () Não
- Infecção bacteriana ou viral () Sim () Não
- Doença cardiovascular () Sim () Não
- Diabete () Sim () Não
- Outras doenças importantes () Sim () Não

FICHA DE SAÚDE
 CÓD. nº:-----
 Página 3

18.b) - Se sim, indique abaixo:

Doença	Período	Tratamento
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____

18.c) - Liste as vacinações que você recebeu nos últimos 12 meses.

Vacina	Data
_____	/ /
_____	/ /
_____	/ /
_____	/ /
_____	/ /

18.d) - Liste os raio-X/ tomografias computadorizadas/ ressonância magnética diagnósticos e terapêuticos, realizados nos últimos 10 anos.

Tipo de exame	Motivo do exame	Data
_____	_____	/ /
_____	_____	/ /
Cirurgia	_____	/ /
_____	_____	/ /
_____	_____	/ /
_____	_____	/ /

18.f)- Dê as datas de quando você teve febre nos últimos 12 meses.

Data	Causa da febre	Medicamento utilizado
/ /	_____	_____
/ /	_____	_____
/ /	_____	_____
/ /	_____	_____

DIETAS

(deve refletir apenas os hábitos freqüentes)

19. Você come apenas vegetais? () Sim () Não

20. Você come carne? () Sim () Não

a) Se sim, com que freqüência você come o seguinte:

Dias por semana

	1 a 2	3 a 4	5 a 6	todos os dias
Carne bovina	()	()	()	()
Peixe	()	()	()	()
Porco	()	()	()	()
Outras	()	()	()	()

b) - Como você prefere sua carne?

() Mal passada () No ponto () Bem passada

21. Você usa adoçantes? () Sim () Não

Quantos por dia? _____

22. Você bebe refrigerantes? () Sim () Não

Quantos por dia ? _____

23. Comente sobre sua dieta, caso ela tenha algo de especial (por exemplo, dieta rica em proteínas e pobre em carboidratos, etc.).

24. Você bebe café? () Sim () Não

Quantas xícaras pequenas por dia? _____

25. Você bebe chá? () Sim () Não

Quantas xícaras por dia? _____

26. Você toma chimarrão? () Sim () Não

Com que frequência? _____

27. Você bebe cerveja? () Sim () Não

Se sim, por favor, indique sua média de consumo semanal:

() 1-6 garrafas por semana

() 7-12 garrafas por semana

() 13-24 garrafas por semana

() Mais de 24 garrafas por semana. Quantas? _____

FICHA DE SAÚDE CÓD. nº:----- Página 5

28. Você bebe vinho? () Sim () Não

Se sim, por favor, indique sua média de consumo semanal:

() 1 – 4 copos por semana ou menos

() 5 – 8 copos por semana

() 9 – 16 copos por semana

() Mais de 16 copos por semana.

Quantos? _____

29. Você bebe outras bebidas alcoólicas (excluindo cerveja e vinho)?

() Sim () Não

Se sim, qual ou quais? _____

Por favor, indique sua média de consumo semanal:

() 1 – 4 copos por semana ou menos

() 5 – 8 copos por semana

() 9 – 16 copos por semana

() Mais de 16 copos por semana.

Quantos? _____

HISTÓRIA GENÉTICA

30. Você tem conhecimento de algum defeito de nascimento ou outra desordem genética ou doença hereditária que tenha afetado seus pais, irmãos, irmãs ou seus filhos?

() Sim () Não

Se sim, por favor, especifique: _____

31. Você ou sua esposa teve ou tem dificuldade para engravidar? () Sim

() Não

Se sim, por favor, especifique: _____

32. Você já teve um filho que tenha nascido prematuramente ou que tenha sido abortado?

() Sim () Não

33. Você tem um gêmeo idêntico vivo?

() Sim () Não

ANEXO I
APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Universidade Federal do Ceará
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. N° 623/08

Fortaleza, 26 de setembro de 2008

Protocolo COMEPE n° 196/ 08

Pesquisador responsável: Elna Joelane Lopes da Silva do Amaral
Dept°/Serviço: Laboratório Central de Saúde Pública/ LACEN/ Piauí
Título do Projeto: "Estudo dos possíveis efeitos genotóxicos de esquemas antiretrovirais contendo Zidovudina"

Levamos ao conhecimento de V.Sª, que o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará – COMEPE, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução n° 196 de 10 de outubro de 1996 e complementares, aprovou o projeto supracitado na reunião do dia 25 de setembro de 2008.

Outrossim, informamos, que o pesquisador deverá se comprometer a enviar o relatório final do referido projeto.

Atenciosamente,

Dra. Mirian Parente Monteiro
Coordenadora Adjunta do Comitê
de Ética em Pesquisa
COMEPE/UFCE