

MARINA AP. SALOMÉ

*ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS E DISTÚRBIOS DO
METABOLISMO DO FERRO EM PACIENTES
INFECTADOS PELO HIV*

CAMPINAS

2002

MARINA AP. SALOMÉ

***ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS E DISTÚRBIOS DO
METABOLISMO DO FERRO EM PACIENTES
INFECTADOS PELO HIV***

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre
em Ciências Médicas, área de Ciências Biomédicas.*

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. HELENA ZERLOTTI WOLF GROTTTO

CAMPINAS

2002

UNIDADE UNICAMP
Nº CHAMADA T/UNICAMP
Sa 36a
V EX
TOMBO BCI 50527
PROC 16-837/02
C DX
PREÇO R\$ 11,00
DATA 22/08/02
Nº CPD

CM00172319-5

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

BFB 10 252401

Sa36a

Salomé, Marina Aparecida

“Alterações hematológicas e distúrbios do metabolismo do ferro em pacientes infectados pelo HIV” / Marina Aparecida Salomé.
Campinas, SP : [s.n.], 2002.

Orientador : Helena Zerlotti Wolf Grotto
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Aids. 2. Anemia. 3. Síndrome de imunodeficiência adquirida. 4. Interferons. I. . Helena Zerlotti Wolf Grotto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Helena Zerlotti Wolf Grotto

Membros:

1.

2.

3.

Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Área de Concentração em Ciências Biomédicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 27/03/2002

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Luiz e Benedicta que revestiram minha existência de amor, carinho e dedicação. Abriram as portas do meu futuro, iluminando meu caminho com a luz mais brilhante que puderam encontrar : O estudo.

Às pessoas queridas, Luiz Emílio, Áurea, Antonia e Paulo, pelo estímulo e palavras amigas nos momentos que mais precisei.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha orientadora,

*Prof^a. Dr.^a. Helena Zerlotti Wolf Grotto
pelo constante apoio, amizade e
colaboração na realização deste trabalho.*

Aos pacientes e voluntários: “aqueles que contribuem para o nosso engrandecimento pessoal e profissional, doando-nos mais do seu corpo, sua alma.... a fim de aprimorarmos nossos conhecimentos e aprendermos novas lições de vida”.

À todos os funcionários do Setor de Coleta do Laboratório de Patologia Clínica – HC/ Unicamp, que contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos do Laboratório de Hematologia, pelo constante apoio e compreensão, principalmente pelo auxílio na realização técnica deste trabalho.

Aos Professores e Funcionários do Departamento de Patologia Clínica, pelo grande apoio, amizade e colaboração na realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Silvia de Barros Mazon pela importante contribuição na revisão do texto e nos conceitos em imunologia.

À Cleide Ap. Moreira Silva da Comissão de Pesquisa Estatística por ter repartido comigo os seus conhecimentos com dedicação e paciência.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior – CAPES, pelo estímulo à pesquisa, através do apoio financeiro.

À FAEP-UNICAMP e CNPq pelo apoio financeiro.

Aos amigos e companheiros do curso de Pós-Graduação, por tornarem esta etapa da minha vida muito mais agradável e prazerosa. Principalmente à Nádia, amiga com quem compartilhei grande parte desta etapa.

Ao Paulo Douglas A. A. de Almeida pelo apoio, compreensão e concessões quando foram necessárias para a realização e término deste trabalho.

Enfim, à todos que direta ou indiretamente partilharam comigo seus conhecimentos e experiências, desvendando dúvidas na busca do saber, para a concretização desta investigação.

	PÁG.
RESUMO	xxxv
1. INTRODUÇÃO	39
Considerações gerais.....	41
1. Estrutura do vírion e seu ciclo replicativo.....	41
1.1. Morfologia do HIV.....	41
1.2. Organização genômica do HIV.....	42
1.3. Ciclo replicativo do HIV.....	44
2. Epidemiologia da aids.....	46
3. Fisiopatologia da aids.....	46
4. Manifestações clínicas da doença.....	47
5. Diagnóstico sorológico.....	50
6. Manifestações hematológicas na aids.....	50
6.1. Anemia.....	50
6.2. Leucopenia.....	53
6.3. Trombocitopenia.....	54
7. Anemia de doença crônica (ADC).....	56
7.1. Definição.....	56
7.2. Mecanismos envolvidos nas alterações do metabolismo do ferro. Participação da atividade da resposta imune na fisiopatogenia da anemia na aids.....	58
7.3. Papel das citocinas na inibição da eritropoiese: TNF- α , IL-1, IFN- γ , IL-6, IL-2.....	61
8. TfR: descrição; função no metabolismo do ferro e participação no processo de ativação de célula-T.....	64
9. Reticulócito (RTC).....	66

2. OBJETIVOS.....	69
3. CASUÍSTICA E MEODOLOGIA.....	73
1. Diagnóstico sorológico.....	76
2. Diagnóstico da anemia / Perfil hematológico.....	76
3. Avaliação do estado do ferro.....	77
4. Avaliação da deficiência de vitamina B12 e ácido fólico.....	78
5. Determinação de IFN- γ	78
6. Avaliação do perfil hepático.....	78
7. Determinação da EPO.....	79
8. Avaliação de anemia hemolítica.....	79
9. Investigação de hemoglobinopatias.....	79
10. Exame da medula óssea.....	79
11. Análise estatística.....	81
4. RESULTADOS.....	83
1. Alterações hematológicas / Caracterização dos tipos de anemia.....	85
2. Classificação do CDC e tipo de anemia.....	90
3. Pacientes com resultados sugestivos de acúmulo de ferro.....	91
4. Avaliação do grupo com ADC, comparando-o com os indivíduos sem anemia.....	92
5. DISCUSSÃO.....	95
6. CONCLUSÃO.....	107
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111
8. ANEXOS.....	123
1. Termo de consentimento.....	125
2. Resultados laboratoriais de todos os pacientes estudados.....	131
3. The influence of IFN γ on iron metabolism in HIV patients with anemia of chronic disease.....	143

LISTA DE ABREVIATURAS

3TC	Lamivudine.
aa	Aminoácidos.
Ác.Fól	Ácido fólico
aids	Acquired Immunodeficiency Syndrome.
ADC	Anemia de Doença Crônica.
ALP	Alkaline phosphatase.
ALT	Alanine aminotransferase.
ARC	aids-Related Complex.
AST	Aspartate aminotransferase.
AZT	Azidotimidina.
B12	Vitamina B12.
BI	Bilirrubina indireta.
CA	Capsídio viral.
CD4	Linfócitos T auxiliares: receptor de células T para MHC classe II.
CD8	Linfócitos T supressores: receptor de células T para MHC classe I.
CD3	Linfócitos T
CD4/CD8	Razão linfócitos-T auxiliares/linfócitos-T supressores.
CDC	Centers for Disease Control and Prevention.
CFU-E	Erythroid-Colony Forming Units.
CGF	Cell growth factor.
CMV	Citomegalovirus.
CSFs	Colony- Stimulating Factors.

D4T	Estavudine.
DDI	Didanosine.
DNA	Deoxyribonucleic acid.
EBV	Epstein-Baar Virus.
EDTA	Etileno-diamino-tetra-acético.
EIA	Enzyme-Immunsorptions-Assay.
ELISA	Enzym linked immunosorbent assay.
env	Envelope.
EPO	Eritropoietina.
Fe	Ferro.
Fe sérico	Ferro sérico
FS	Ferritina sérica
G1	Growth 1 (fase 1 de crescimento).
G6PD	Glicose 6 fosfato desidrogenase.
G-CSF	Granulocyte Colony-Stimulating Factor.
gag	Antígeno grupo específico.
G-CSF	Granulocytic-Colony Stimulating Factor.
GGT	Gamma- glutamyltransferase.
gp	Glicoproteína.
GTP	Guanosina trifosfato.
HAART	Highly Active Antiretroviral Therapy.
Hb	Hemoglobina.
HCM	Hemoglobina corpuscular média.
HFR	High- fluorescence reticulocyte fraction.

HIV	Human Immunodeficiency Virus.
Hp	Haptoglobina.
IDN	Indinavir.
IFN	Interferon.
IL	Interleucina.
IMR	Índice de maturidade dos reticulócitos.
IN	Integrase.
Kb	Kilo base.
Kd	kilo dalton
LDH	Lactate dehydrogenase.
LGP	Linfoadenopatia generalizada persistente.
LTR	Long terminal repeat.
MA	Matriz protéica.
MEIA	Microparticle Enzyme Immunoassay.
MFI	Mean fluorescence index.
MFR	Medium- fluorescence reticulocyte fraction.
MO	Medula óssea.
n	Número de pacientes.
NC	Proteínas nucleares.
nef	Gene acessório não essencial.
NF-kB	Nuclear factor kB.
NK	Natural Killer cells.
NFV	Nelfinavir.
N ou nl	Normal.

OMS	Organização mundial da saúde.
p	Proteína.
PLT	Plaquetas.
pol	Polimerase.
PR	Protease.
RBC	Red Blood Cell Count.
rer	Transativador pós transcricional.
RNA	Ribonucleic acid.
RNase H	Ribonuclease H.
ROI	Reactive Oxygen Intermediates.
RT	Reverse Transcriptase.
RTC	Reticulócitos.
RTV	Ritonavir.
S	Synthesis.
SD	Standard Deviation.
sTfR	soluble transferrin receptor.
SU	Proteína de superfície.
tat	Transativador da transcrição.
TCGF	T-cell growth factor.
Tf	Transferrina.
TfR	Transferrin Receptor.
Th	Células T “ helper “.
TIBC	Transferrin/total iron-binding capacity.
TM	Transmembrana.

TNF	Tumor Necrosis Factor.
VCM	Volume corpuscular médio.
vif	Fator de infectibilidade.
Vit.	Vitamina.
vpr	Gene de atuação na replicação viral.
vpu	Gene de atuação na liberação da partícula viral.
WBC	Whithe Blood Cell Count.
ZDV	Zidovudine.

SINAIS

↑	aumento.
↓	diminuição.
=	igual.
<	menor.
>	maior.
≥	maior ou igual.
≤	menor ou igual.

	PÁG.
Tabela 1: Função dos genes não estruturais.....	43
Tabela 2: Classificação do CDC dos pacientes HIV positivo nas diferentes categorias clínicas.....	75
Tabela 3: Valores de referência do grupo normal e os valores de referência dos kits.....	80
Tabela 4: Classificação dos pacientes estudados em relação à presença ou ausência de anemia, e porcentagem em relação ao sexo.....	85
Tabela 5: Tipos de anemias diagnosticadas a partir do protocolo laboratorial proposto.....	86
Tabela 6: Dados hematológicos e parâmetros referentes ao metabolismo do ferro em pacientes com ADC.....	87
Tabela 7: Porcentagem de pacientes com e sem anemia que mostraram anormalidades nas contagens de plaquetas, leucócitos, linfócitos, neutrófilos e reticulócitos.....	88
Tabela 8: Classificação do CDC dos pacientes HIV positivo nos diferentes grupos estudados.....	91
Tabela 9: Pacientes anêmicos, excetuando os com diagnósticos de ADC, Anemia ferropriva e Anemia megaloblástica que mostraram níveis de FS e suas respectivas classificações.....	92
Tabela 10: Parâmetros relacionados ao estado do ferro nos grupos estudados. Os resultados estão em mediana (mínimo-máximo).....	93
Tabela 11: Valores de mediana (mínimo-máximo) das variáveis referentes à eritropoiese, relação CD4/CD8 e níveis de IFN- γ nos grupos com e sem anemia.....	93

Tabela 12:	Coeficiente de correlação de Spearman (r) entre as variáveis nos grupos ADC e sem anemia.....	94
Tabela 13:	Valores de referência do grupo normal e os valores de referência dos kits.....	131
Tabela 14:	Grupo de pacientes com anemia microcítica e hipocrômica.....	133
Tabela 15:	Grupo de pacientes com anemia macrocítica e hiperocrômica.....	135
Tabela 16:	Grupo de pacientes com anemia normocítica e normocrômica.....	137
Tabela 17:	Grupo de pacientes HIV positivo sem anemia.....	139
Tabela 18:	Grupo de pacientes com ADC.....	141

	PÁG.
Figura 1: Estrutura do vírus HIV.....	42
Figura 2: Representação esquemática do genoma do HIV e das proteínas estruturais.....	43
Figura 3: Ciclo replicativo do HIV.....	45
Figura 4: Possível mecanismo patogênico da ADC.....	57
Figura 5: Efeito da 7,8-dihidroneopterina na replicação do HIV.....	60
Figura 6: Ação de citocinas sobre a eritropoiese e metabolismo do ferro na fisiopatologia da ADC.....	63
Figura 7: Representação da estrutura do receptor da transferrina (TfR).....	64
Figura 8: Esquema representativo do transporte do ferro pela transferrina, processo de endocitose e liberação do ferro.....	65
Figura 9: Protocolo de investigação laboratorial das anemias em pacientes infectados pelo HIV.....	81
Figura 10: Alterações hematológicas observadas nos grupos com anemia (n=69) e sem anemia (n=42).....	90

	PÁG.
Quadro 1: Sistema de classificação da infecção pelo HIV revisado em 1993 e definição ampliada dos casos para notificação do HIV para adolescentes e adultos.....	48
Quadro 2: Condições incluídas na definição de 1993 para a notificação dos casos da aids.....	49
Quadro 3: Causas de anemia na infecção pelo HIV.....	51
Quadro 4: As drogas e suas alterações hematológicas.....	52
Quadro 5: Causas da neutropenia na aids.....	54
Quadro 6: Causas da trombocitopenia secundária.....	55



RESUMO

Pacientes infectados pelo HIV apresentam diversas alterações hematológicas, relacionadas principalmente às citopenias. Dentre elas, a mais freqüente é a anemia caracterizada, na maior parte dos casos, como anemia de doença crônica (ADC), cuja etiologia é multifatorial. O objetivo deste trabalho foi estudar diversos aspectos relacionados à hematopoiese em pacientes com aids, e através dessa análise inicial, selecionamos um grupo com ADC para avaliar a associação entre os aspectos hematológicos, alterações do metabolismo do ferro e a associação com níveis de IFN- γ . Parâmetros relacionados com o metabolismo de Fe, tais como Fe sérico, ferritina sérica (FS), receptores solúveis de transferrina (sTfR) e parâmetros relacionados com a hematopoiese, tais como eritropoietina (EPO), hemoglobina (Hb), reticulócitos (RTC), plaquetas (PLT) e linfócitos foram correlacionados com IFN- γ e os resultados foram comparados com um grupo de 42 pacientes HIV positivo não anêmicos. Foram realizados os testes para investigação do diagnóstico sorológico, avaliação do perfil hepático, perfil hematológico, estudo do metabolismo do ferro, determinação de IFN- γ e dosagem de EPO com a finalidade de determinar a gravidade da doença e a resposta da medula óssea. Os nossos resultados mostraram a freqüência das alterações hematológicas, principalmente as citopenias, nos pacientes HIV positivo estudados. A maioria dos pacientes com anemia apresentaram morfologia normocítica-normocrômica e característica laboratorial de ADC. Além da série vermelha, observamos outras anormalidades hematológicas em relação às contagens de plaquetas, leucócitos, linfócitos, neutrófilos e RTC nos 111 pacientes estudados. Observamos, também, concentrações de FS elevados em pacientes com ADC e dosagens de sTfR normal ou levemente elevados em ambos os grupos. Não houve correlação entre IFN- γ e FS e entre determinações de IFN- γ e sTfR. Baixos valores de CD4/CD8 foram obtidos nos pacientes com ADC e uma correlação inversa foi observada entre IFN- γ e CD4/CD8 nos grupos com e sem anemia. As contagens de RTC e as concentrações de EPO foram similares em ambos os grupos e as porcentagens de RTC imaturos estavam elevadas em pacientes anêmicos, indicando uma aparente tentativa da resposta medular para compensar o aumento da demanda. De acordo com os nossos dados não foi possível confirmar a associação entre o IFN- γ e os distúrbios no metabolismo do Fe na ADC, mas nossos resultados reforçam o importante papel do IFN- γ na gravidade da doença e a proeminente deterioração do sistema imunológico nos pacientes HIV positivo

com ADC. Pudemos, ainda, constatar a dificuldade de se estabelecer o diagnóstico laboratorial da causa da anemia nesses pacientes.



INTRODUÇÃO

“ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS E DISTÚRBIOS DO METABOLISMO DO FERRO EM PACIENTES INFECTADOS PELO HIV”

A *Acquired Immunodeficiency Syndrome* (aids) foi reconhecida em 1979 e o *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) foi descrito em 1983, por Gallo. Desde então, inúmeras investigações tem se desenvolvido em diversos aspectos relacionados à doença, na tentativa de melhor compreender a natureza do vírus causador, as repercussões clínicas relacionadas à infecção e, principalmente, uma possível cura (Rhame, 1989).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que até o final do século o número de pessoas infectadas pelo HIV seria de 15 a 20 milhões, e o número de casos de aids seria de 5 a 6 milhões (Hoffbrand & Pettit, 1993). Em dezembro de 2000, 36,1 milhões de pessoas em todo o mundo estavam infectadas pelo HIV, mais de 21,8 milhões de pessoas já morreram e mais de 14 mil novas infecções ocorrem diariamente (E-infecto.com.br).

Embora até o momento o quadro evolutivo da aids seja letal, nos anos 90, surgiu uma *Highly Active Antiretroviral Therapy* (HAART). Esta terapia consiste da combinação de 3 drogas, geralmente dois inibidores da *reverse transcriptase* (RT) e um inibidor da protease (PR). A introdução da terapia HAART vem produzindo uma substancial redução do ritmo da replicação viral, com conseqüentes reduções das infecções oportunistas e da taxa de mortalidade (Moore, 2000).

1. ESTRUTURA DO VÍRION E SEU CICLO REPLICATIVO

1.1. MORFOLOGIA DO HIV

O HIV é um retrovírus de aproximadamente 100 nm de diâmetro, envelopado, apresentando em sua superfície uma membrana lipídica oriunda da membrana externa da célula do hospedeiro e duas glicoproteínas (gp 120 e gp 41). Internamente a essa membrana, está a matriz protéica (p17) e o capsídeo viral de forma cônica (p24). No interior do capsídeo viral está localizado o genoma do vírus, contendo duas fitas idênticas de RNA, as enzimas RT (p51/p66), PR (p10) e integrase (IN) (p32) e o núcleo capsídeo formado pelas proteínas p7 e p9 (Figura 1) (Lomar & Diamant, 1999; Abbas et al, 2000).

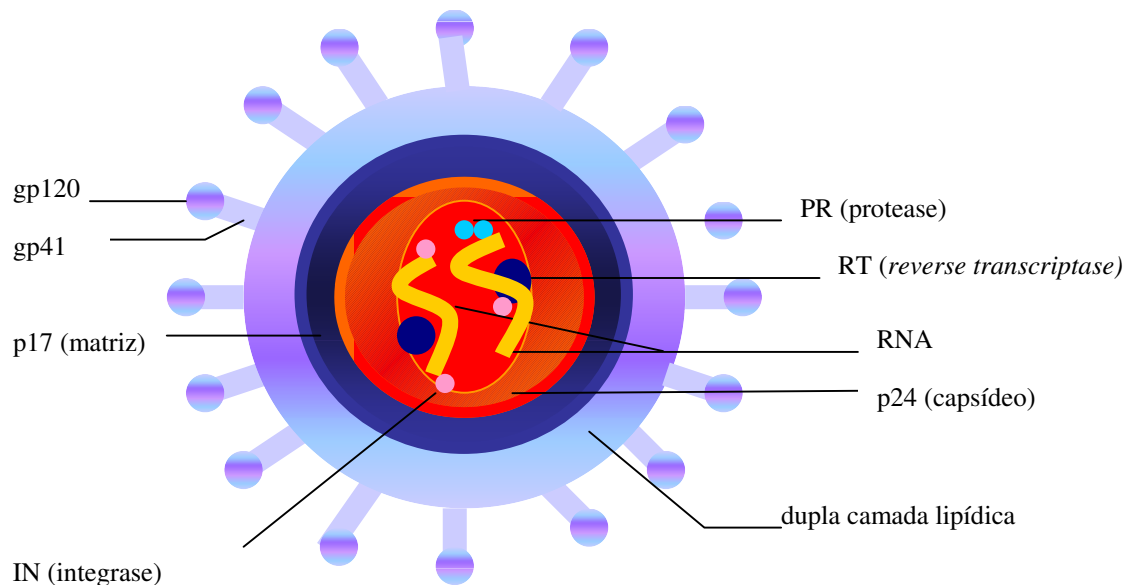


Figura 1: Estrutura do vírus HIV (Adaptado de Abbas et al, 2000).

1.2. ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO HIV

O genoma do HIV, de aproximadamente 10Kb, contém 9 genes e duas regiões denominadas *long terminal repeat* (LTR), onde estão presentes os elementos que controlam a integração, a transcrição e a poliadenilação dos RNA mensageiros. Os genes podem ser divididos em dois grupos: os que codificam as proteínas estruturais (gag, pol e env) e os que codificam as proteínas não estruturais (tat, rev, nef, vif, vpr e vpr).

O *gene gag* (antígeno grupo-específico) codifica a matriz protéica (MA ou p17), o capsídeo viral (CA ou p24) e as proteínas nucleares (NC ou p6 e p7). O *gene pol* (polimerase) codifica as seguintes enzimas virais: RT ou p51/p66, que também possui atividade de RNaseH; PR ou p10; e IN ou p32. O *gene env* (envelope) codifica uma proteína inicial de 160 kd, que é clivada dando origem à proteína de transmembrana (TM ou gp41) e à proteína de superfície (SU ou gp120). A gp120 apresenta 5 regiões variáveis intercaladas por regiões conservadas. Um dos epítomos variáveis, designado V3, é formado

por uma alça, composta de 35 aminoácidos, unida por pontes dissulfeto. Essa região é imunodominante e contra ela são produzidos anticorpos neutralizantes (**Figura 2**) (**Lomar & Diament, 1999; Abbas et al, 2000**).

Os genes não-estruturais podem ser subdivididos em regulatórios (tat e rev), que são necessários para a replicação viral “in vitro”, e em genes acessórios (vif, vpr, vpu e nef), que não são essenciais. A função desses genes está resumida na **Tabela 1** (**Lomar & Diament, 1999**).

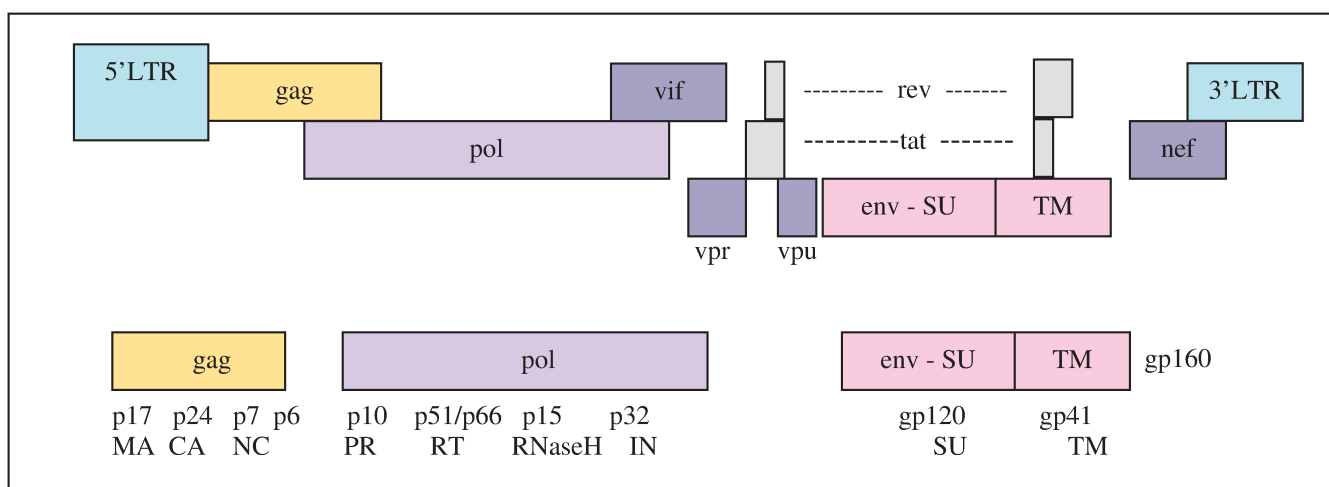


Figura 2: Representação esquemática do genoma do HIV e das proteínas estruturais.
(Adaptado de Lomar & Diament, 1999).

Tabela 1: Função dos genes não-estruturais

Gene	Função
rev (p19)	Transativador pós-transcricional (atuaria no processamento, transporte e tradução dos RNA mensageiros).
tat (p14)	Transativador da transcrição.
vif (p23)	Fator de infectividade (provavelmente atua na maturação da proteína do envelope).
vpr (p15)	Atua na replicação viral.
vpu (p15)	Atua na liberação da partícula viral.
nef (p27)	Função controversa na literatura; pode reduzir ou aumentar a replicação viral. Parece diminuir a expressão de CD4 na superfície.

Adaptado de Lomar & Diament, 1999.

1.3. CICLO REPLICATIVO DO HIV

O ciclo replicativo do HIV se inicia através da interação da gp120 com receptores CD4 presentes na superfície de linfócitos T auxiliares (células CD4). Após esta interação, a gp120 sofre uma reestruturação expondo a alça V3, onde ocorre a interação da gp120 com os receptores de quimiocinas, sem a qual não haveria penetração do vírus na célula. Ocorrida a penetração, o material genético do vírus é injetado na célula hospedeira, as enzimas RT e RNaseH copiam o RNA viral para uma dupla fita de DNA complementar removendo a fita molde de RNA. O DNA complementar é integrado ao genoma da célula hospedeira através da ação da IN. A partir do pró-vírus (DNA integrado) são produzidas as proteínas virais e o RNA. A PR cliva a poliproteína, originando as proteínas do envelope e nucleocapsídeo.

O vírion é liberado da célula por brotamento, envolvido pela dupla membrana fosfolipídica e com capacidade de infectar novas células. Essa reação ocorre no citoplasma da célula nas primeiras 6 horas de infecção (**Figura 3**) (**Abbas et al, 2000**).

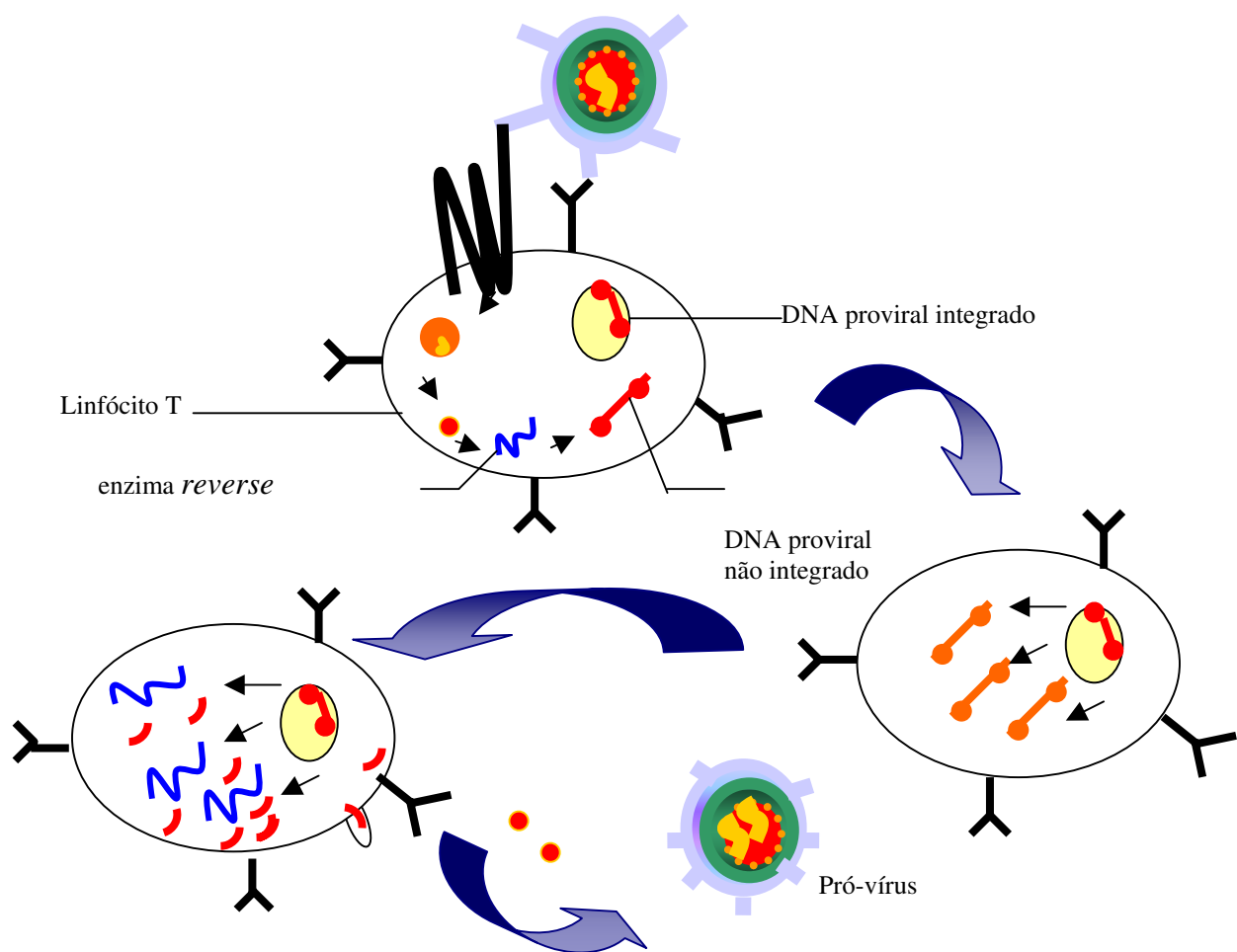


Figura 3: Ciclo replicativo do HIV. (Adaptada de Abbas et al, 2000).

2. EPIDEMIOLOGIA DA aids

Segundo Gallo (1988), o vírus originou-se, provavelmente, nos primatas da África Central e rapidamente adaptou-se a humanos, passando a ser uma doença de difícil controle devido ao modo de transmissão.

Em todo o mundo foram isolados dois sorotipos do HIV (HIV-1 e HIV-2). No Brasil, predomina o HIV-1, sendo pouco frequentes os registros de infecção pelo HIV-2 (BRASIL – Ministério da Saúde, 1998).

O HIV pode ser contraído através do contato sexual, por transfusão sangüínea, uso de agulhas compartilhadas, por transmissão perinatal e acidente profissional. Convém lembrar que vetores alados, contato social e fômites não apresentam risco de transmissão do HIV (Lewi et al, 1997).

3. FISIOPATOLOGIA DA aids

Resumidamente, a conseqüência mais importante da infecção causada pelo HIV é a destruição do sistema imunológico celular do indivíduo, principalmente a depleção dos linfócitos-T CD4⁺, principal receptor do HIV-1 (Rhame, 1989).

Hoje sabemos que outras células, especialmente macrófagos teciduais, podem ser infectados pelo HIV, e que ocorre considerável replicação viral nos linfonodos desde o início da infecção (Lewi et al, 1997).

A alteração na resposta imunológica mediada pelos linfócitos-T predispõe a uma série de infecções oportunistas e ao acometimento de doenças malignas, além de danos a diversos órgãos, como sistema nervoso central, trato gastrointestinal e medula óssea (Rhame, 1989).

4. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA DOENÇA

O *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) dos Estados Unidos propôs uma classificação clínica para os portadores do HIV de acordo com a evolução natural da doença e é adotada, praticamente, por todos os centros de tratamento e pesquisa em aids. A atual definição proporciona um método coerente que permite monitorar as tendências de morbidez e mortalidade associadas ao HIV (Quadros 1 e 2). Os pacientes infectados pelo HIV exibem um amplo espectro de manifestações, que vão desde a ausência de sintomas até a aids.

De acordo com o **Quadro 1**, na categoria clínica A (A1, A2 e A3) estão os pacientes portadores da infecção assintomática por HIV e que podem apresentar linfadenopatia generalizada (gânglios em dois ou mais sítios extra-inguinais, com pelo menos 1 cm de diâmetro por 3 meses ou mais e doença aguda por HIV). Na categoria B (B1, B2 e B3) estão os pacientes sintomáticos, excluindo os transtornos relatados em A ou C. Os exemplos de patologias incluem, entre outras: angiomatose bacilar; candidíase vulvovaginal (persistente por mais de um 1 mês com pouca resposta ao tratamento); candidíase orofaríngea; displasia cervical grave ou carcinoma “in situ” e sintomas constitucionais como, por exemplo, febre ou diarreia por mais de 1 mês. As condições clínicas da categoria C estão descritas no **Quadro 2**. As categorias A3, B3 e C1 a C3 são consideradas aids por apresentar número de células CD₄ <200/mm³ (Curran, 1997).

Quadro 1: Sistema de classificação da infecção pelo HIV revisado em 1993 e definição ampliada dos casos para notificação de HIV para adolescentes e adultos.

Categorias Clínicas			
Categorias de CD4	A Infecção assintomática Por HIV, LGP	B Sintomático Agudo não relatado em A ou C	C Condições aids
$\geq 500/\text{mm}^3$	A1	B1	C1
200-499/ mm^3	A2	B2	C2
$<200/\text{mm}^3$ contagem de células-T indicadora de aids	A3	B3	C3

Adaptado de Curran, 1997. A área marcada em azul indica as condições incluídas na definição de 1993 para a vigilância dos casos de aids para adolescentes e adultos. A área marcada em cinza deve ser relatada como aids.

As condições clínicas em C estão relacionadas no quadro 2.

LGP= linfadenopatia generalizada persistente

Quadro 2.: Condições incluídas na definição de 1993 para a notificação dos casos de aids.

Câncer de colo uterino invasivo♦
Candidíase dos brônquios, da traquéia ou dos pulmões
Candidíase esofagiana
Coccidioidomicose disseminada ou extrapulmonar
Complexo <i>Mycobacterium avium</i> ou <i>Kansasii</i> , disseminada ou extrapulmonar
Criptococose extrapulmonar
Criptosporidiose intestinal crônica (com duração > 1 mês)
Doença pelo citomegalovírus (com exceção de fígado, baço ou gânglios linfáticos)
Encefalopatia relacionada com o HIV
Herpes simples, úlcera crônica (com duração > 1 mês), bronquite, pneumonia ou esofagite
Histoplasmose disseminada ou extrapulmonar
Infecções bacterianas múltiplas ou recidivantes*
Isosporíase intestinal crônica (com duração > 1 mês)
Leucoencefalopatia multifocal progressiva
Linfoma de Burkitt
Linfoma imunoblástico
Linfoma primário do cérebro
<i>Mycobacterium</i> , outras espécies ou espécies ainda não identificadas, disseminado ou extrapulmonar
Pneumonia intersticial linfóide e/ou hiperplasia linfóide pulmonar*
Pneumonia por <i>Pneumocystis carinii</i>
Pneumonia recidivante♦
Retinite pelo citomegalovírus (com perda da visão)
Sarcoma de Kaposi
Septecemia por <i>Salmonella</i> , recidivante
Síndrome de desgaste devido ao HIV
Toxoplasmose cerebral
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , qualquer local (pulmonar♦ ou extrapulmonar)

Adaptado de Curran, 1997

♦ Acrescentados na definição ampliada de 1993 para a vigilância dos casos de aids em adolescentes e adultos.

* Crianças < 3 anos de idade.

5. DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

São vários os testes atualmente disponíveis para o diagnóstico sorológico da aids. O *Ensaio Imunoenzimático* ou *ELISA* é o teste de triagem mais utilizado devido a sua sensibilidade, especificidade, facilidade de automação e praticidade. Existem vários testes que podem ser utilizados para a confirmação do ELISA, no laboratório de aids (HC/Unicamp) utiliza-se a técnica de *Western-Blot*, que apresenta a vantagem de detectar a presença de anticorpos contra determinadas proteínas do vírus, e não somente o vírus (Lewi et al, 1997).

6. MANIFESTAÇÕES HEMATOLÓGICAS NA aids

As alterações hematológicas na aids podem ser resumidas nas manifestações relacionadas às diversas citopenias: anemia, leucopenia e trombocitopenia (Coyle, 1997).

6.1. ANEMIA

A anemia é observada na maior parte dos pacientes com aids e sua incidência avança à medida que progride a deterioração imunológica do paciente (Aboulafia & Mitsuyasu, 1991).

Em geral, a anemia é do tipo normocítica e normocrômica e vários fatores estão relacionados às possibilidades etiológicas da anemia (Quadro 3). A baixa porcentagem de reticulócitos (RTC) sugere tratar-se de anemia hipoproliferativa ou por hematopoiese inefetiva. São apontadas como possíveis causas de anemia associada ao HIV: infecção das células progenitoras eritróides pelo HIV; ação de drogas mielossupressoras; deficiência de vitamina B12, folato e/ou ferro (devido à má nutrição, à má absorção, ou distúrbio na utilização desses elementos); hemólise auto-imune; aplasia de medula óssea induzida por drogas ou parvovírus do tipo B19; presença de células neoplásicas na medula óssea (linfomas, sarcoma de Kaposi); perda sangüínea; infecção da medula óssea (ex.: por micobactérias); e deficiência de eritropoietina (EPO) (Aboulafia & Mitsuyasu, 1991; Kreuzer & Rockstroh, 1997; Evans & Scadden, 2000).

Essa multiplicidade de fatores envolvidos torna o estudo das alterações hematológicas na aids bastante diversificado, exigindo uma análise clínica e laboratorial minuciosas até que se esclareçam de maneira definitiva as possíveis causas da anemia e, assim, determinar a melhor terapêutica para revertê-la ou, pelo menos, minimizá-la (Aboulafia & Mitsuyasu, 1991; Hoffbrand & Pettit, 1993).

Merece menção, a participação de várias drogas usadas no tratamento da aids e sua relação com alterações hematológicas descritas (**Quadro 4**).

Quadro 3: Causas de anemia na infecção pelo HIV.

POSSÍVEIS CAUSAS DA ANEMIA EM PACIENTES HIV POSITIVO
Infecção Bacteremia e Sepsis Infiltração na medula óssea Infecção fúngica disseminada Infecção micobacteriana disseminada Infecção por <i>P.carinii</i> disseminada Infecção viral Parvovírus B19 Citomegalovirus (CMV) Epstein-Barr Virus (EBV) HIV-1 Doenças Malignas Linfoma Não-Hodgkin Sarcoma de Kaposi Deficiência de vitamina B12 Deficiência de folato (deficiência nutricional ou má absorção jejunal) Deficiência de ferro Sangramento gastrointestinal Anemia hemolítica autoimune Púrpura trombocitopênica trombótica Coagulação intravascular disseminada Hiperesplenismo Drogas (Quadro 4)

Adaptado de Evans & Scadden, 2000.

Quadro 4: As drogas e suas alterações hematológicas.

DROGAS RELACIONADAS COM AS ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS NA INFECÇÃO PELO HIV
Agentes anti-retrovirais AZT (azidotimidina) – macrocitose ; neutropenia
Terapia para infecções oportunistas Anfotericina – anemia Dapsona – anemia hemolítica Flucitosina – macrocitose Ganciclovir – neutropenia, principalmente quando usada com AZT Primaquina – anemia hemolítica e neutropenia Piremetamina – leucopenia Sulfametoxazole-trimetoprim – aplasia de medula; neutropenia e anemia hemolítica em pacientes com deficiência de G6-PD Trimetrexate – leucopenia
Terapia anti-tumor – anemia e leucopenia
Interferon – reações locais

As primeiras drogas anti-retrovirais a serem desenvolvidos para a terapia da infecção por HIV foram os didesoxinucleosídeos, análogos especiais de nucleosídeos que possuem um açúcar e uma base de purina ou pirimidina. O primeiro a ser submetido a testes clínicos foi a 3'-azido-2',3'-didesoxitimidina, também denominada azidotimidina (AZT) ou zidovudine (ZDV).

Ao penetrar nas células, o AZT e outros nucleosídeos são ativados formando o 5'-trifosfato. Este processo de ativação, utilizando uma série de enzimas quinases, denomina-se fosforilação anabólica. Na forma de trifosfato, os didesoxinucleosídeos atuam como inibidores do processo de RT do HIV (**Katz & Hollander, 1998**).

Foi observado que a terapia com AZT, dependendo da dose, está associada à toxicidade hematológica causando anemia, macrocitose, eritropoiese megaloblástica e pancitopenia. O grau de toxicidade hematológica é menor quando o AZT é usado em doses pequenas ou fazendo parte de terapia tripla (combinação de AZT e mais duas outras drogas), do que quando é administrado como monoterapia em altas doses. A Estavudine (D4T) parece apresentar toxicidade hematológica similar ao AZT, embora esta toxicidade seja bem menor quando comparada à de outros inibidores de nucleosídeos, como a Didanosine (DDI) e a Lamivudine (3TC). A droga Ganciclovir, usada para tratar as infecções causadas por citomegalovirus, pode causar neutropenia. Cotrimoxazole, usada para pneumocistose, e Pirimetamina/Sulfadiazina, usada para toxoplasmose, podem causar pancitopenia. Dapsona, usado para prevenir e tratar pneumocistose, pode causar metahemoglobinemia e anemia hemolítica com presença de corpos de Heinz (**Steinberg et al, 1991; Potts et al, 1992**).

6.2. LEUCOPENIA

Perkocha & Rodgers, em 1988, fazendo uma revisão sobre o assunto, observaram que a leucopenia, juntamente com a anemia, é uma anormalidade hematológica bastante comum em pacientes com aids. Foi descrito que a leucopenia pode ocorrer em 19 a 41% dos pacientes com linfadenopatia generalizada persistente, e que a leucopenia pode ser resultado de uma granulocitopenia, linfocitopenia, ou ambas.

Morfologicamente, linfócitos atípicos podem ser encontrados no sangue periférico de pacientes com aids avançada, e quase sempre estão associados com linfocitopenia (**Spivak et al, 1984**). Outras alterações morfológicas observadas incluem alterações de segmentação de neutrófilos e atipias e vacuolização de monócitos (**Aboulafia & Mitsuyasu, 1991**).

Uma outra anormalidade na série branca observada em pacientes com aids é a neutropenia, cujo grau está correlacionado diretamente com o grau de imunossupressão. Clinicamente, uma significativa neutropenia é observada em 5-10% dos pacientes durante o estágio assintomático, e entre 50-70% dos pacientes imunocomprometidos.

Assim como outras citopenias, a etiologia da neutropenia em pacientes com aids é multifatorial. Estudos propõem mecanismos que incluem o efeito do HIV nas células progenitoras mielóides e a disfunção da medula óssea. As causas da neutropenia na aids estão resumidas no **quadro 5 (Evans & Scadden, 2000)**.

A ação de drogas causando neutropenia é bastante descrita. Além do AZT, outras drogas que causam neutropenia são: ganciclovir; cotrimoxazole; sulfadiazina-pirimetamina, usada no tratamento de toxoplasmose; aciclovir, usada no tratamento de herpes zoster ou herpes simples; e drogas quimioterápicas antitumor (**Evans & Scadden, 2000**).

Quadro 5: Causas da neutropenia na aids (Adaptado de Evans & Scadden, 2000).

CAUSAS DA NEUTROPENIA NA aids		
Infecção		Doenças malignas
Bacteremia e sepsis	Epstein-Barr Virus (EBV)	Linfoma Não-Hodgkin
Brucelose	HIV	Metástase de medula óssea
Citomegalovirus (CMV)	Influenza	Drogas
Infecções fúngicas disseminadas	Hepatite	Quadro 4
Infecção micobacteriana disseminada	Leishmaniose	
Salmonella		

6.3. TROMBOCITOPENIA

Assim como a anemia e a leucopenia, a trombocitopenia é uma alteração hematológica frequentemente observada em pacientes infectados pelo HIV durante a progressão da doença. É uma das alterações hematológicas mais precoces nos pacientes HIV positivo assintomáticos, apresentando-se, com frequência, como hemocitopenia isolada, o que tem sido utilizado como argumento para apoiar seu caráter imune (**Román et al, 1992**). A trombocitopenia associada com a infecção pelo HIV pode ser dividida em dois grupos: 1) trombocitopenia associada à infecção primária por HIV; e 2) trombocitopenia secundária. Os fatores que podem causar uma trombocitopenia secundária estão descritos no **Quadro 6 (Evans & Scadden, 2000)**.

Quadro 6: Causas da trombocitopenia secundária. (Adaptado de Evans & Scadden, 2000).

CAUSAS DA TROMBOCITOPENIA SECUNDÁRIA	
Infecções Bacterianas Bacteremia e sepsis Bartonella	Maligna Sarcoma de Kaposi Linfoma Não-Hodgkin Carcinoma Metastásico
Fúngica Histoplasmosse Coccidioidomicose	Hiperesplenismo Hepatite crônica Cirrose
Drogas Aciclovir Quimioterapia Ganciclovir Pirimetamina Rifabutina Rifampicina Sulfametoxazole-trimetoprim Cetoconazol Pentamidina	Púrpura trombocitopênica trombótica Coagulação intravascular disseminada Parasitas Toxoplasmose Babesiose Viral Citomegalovirus Epstein-Barr Rubéola HIV

7. ANEMIA DE DOENÇA CRÔNICA (ADC)

7.1. DEFINIÇÃO

Entre as várias formas de anemia que pacientes HIV positivo apresentam, a mais freqüente é a ADC, que pode apresentar-se sob a forma de normocitose e normocromia ou leve microcitose e hipocromia, determinações de ferro (Fe) sérico e *Transferrin/total-iron binding capacity* (TIBC) reduzidas, aumento do estoque de ferro em macrófagos e elevação da ferritina sérica (FS) (Coyle, 1997).

Cartwright (1996) descreve três possíveis processos patogênicos envolvidos na ADC: **1)** menor sobrevida dos eritrócitos, **2)** deficiência da medula óssea em aumentar a produção de hemácias para compensar a maior demanda, e **3)** uma liberação prejudicada do Fe pelo sistema reticuloendotelial para ser utilizado na eritropoiese. Mais recentemente os estudos tem avançado na direção da participação de várias citocinas envolvidas na resposta inflamatória nos distúrbios do metabolismo do Fe (Coyle, 1997).

A ativação de macrófagos ou células reticuloendoteliais, pode resultar numa atividade fagocítica aumentada e, conseqüentemente, sobrevida reduzida dos eritrócitos e liberação de citocinas que podem mediar outros processos envolvidos na patogênese da ADC (Sears, 1992).

Na presença de um processo infeccioso ou inflamatório, ocorre ativação dos macrófagos, redução da síntese de proteínas com conseqüente redução de transferrina (Tf), albumina e EPO. O aumento da síntese de apoferritina, que acompanha a ativação do processo, resulta numa menor liberação de Fe que é incorporado como ferritina, com conseqüente diminuição do Fe. Os macrófagos ativados, podem aumentar a fagocitose dos eritrócitos, reduzindo a sobrevida dos mesmos, além de aumentar a secreção de IL-1, que inibe o crescimento de colônias eritróides e a resposta da EPO. A IL-1 é um importante mediador da resposta de fase aguda, e age sobre os neutrófilos induzindo-os à liberação do conteúdo de seus grânulos, principalmente a lactoferrina. Em meio ácido, devido à infecção, a lactoferrina apresenta maior afinidade ao Fe do que a Tf, ligando-se então a ele e estocando-o nos macrófagos. A **Figura 4** ilustra os principais mecanismos envolvidos nos distúrbios do metabolismo do Fe que ocorrem na ADC.

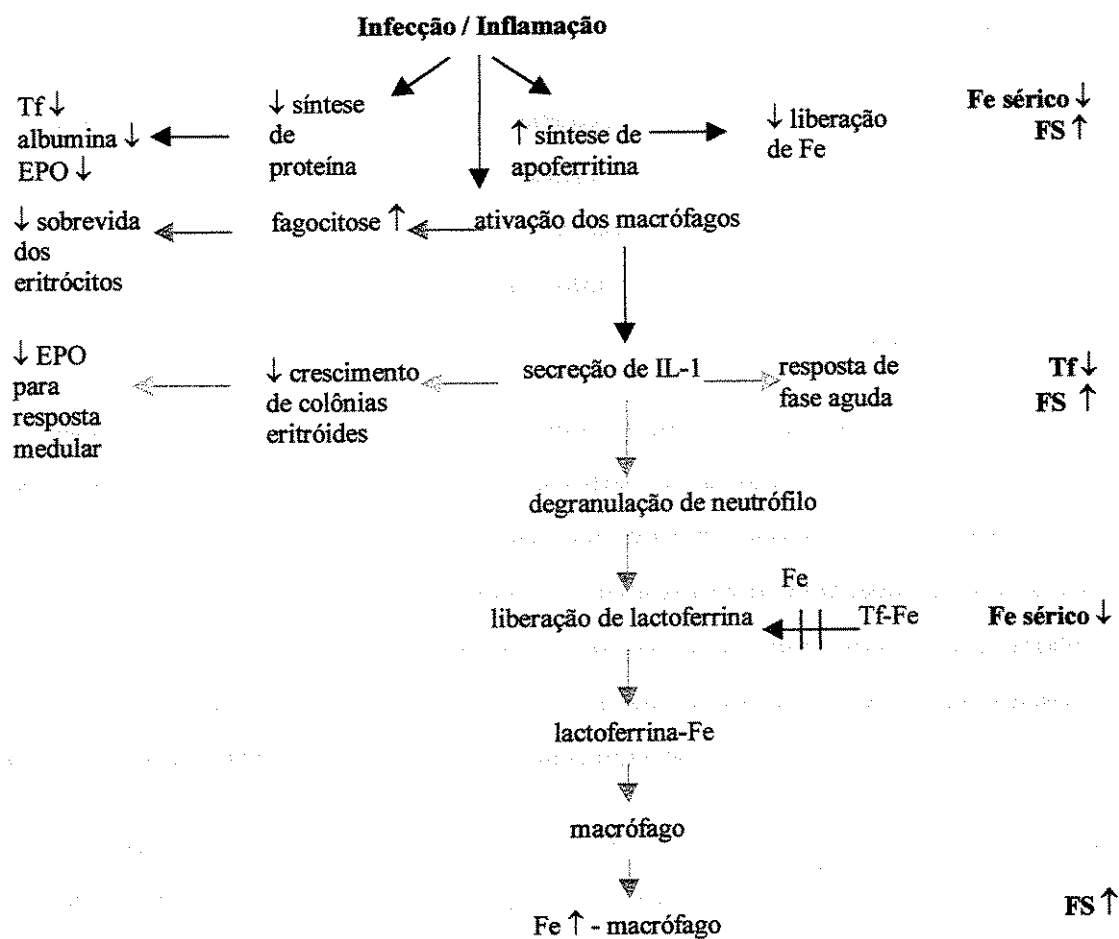


Figura 4: Possível mecanismo patogênico da ADC. Adaptado de Sears, 1992.

7.2. MECANISMOS ENVOLVIDOS NAS ALTERAÇÕES DO METABOLISMO DO FERRO. PARTICIPAÇÃO DA ATIVIDADE DA RESPOSTA IMUNE NA FISIOPATOGENIA DA ANEMIA NA *aids*

A infecção pelo HIV desencadeia uma profunda alteração nos mecanismos de defesa, predispondo à infecções oportunistas e tumores. A intensa alteração da resposta imune humoral e celular é representada pela combinação de fenômenos característicos de imunodeficiência, como a depleção linfocitária e ausência de resposta à determinados estímulos (**Román et al, 1992**).

Citocinas são hormônios protéicos, produzidos durante a ativação da fase efetora da imunidade inata e/ou específica, em resposta a um determinado processo inflamatório e/ou infeccioso. Iniciam sua ação através da ligação à receptores específicos localizados na superfície da célula alvo, podendo atuar de maneira autócrina ou parácrina. Embora cada citocina tenha uma atividade biológica diferente, elas não agem sozinhas, mas compõem uma rede complexa na qual a produção de uma determinada citocina influenciará a produção ou a resposta de várias outras citocinas (**Roitt et al, 1999; Abbas et al, 2000**).

Após o conhecimento de que citocinas específicas liberadas por distintas subpopulações de células-T auxiliares [T “helper” tipo 1 (Th-1) e T “helper” tipo 2 (Th-2)] são fundamentais na determinação da resposta imune celular e humoral, permitiu um importante progresso na compreensão da fisiopatogenia da infecção pelo HIV (**Lewi et al, 1997**).

As células Th-1, responsáveis pela indução da resposta imune celular, produzem interferon (IFN)- γ , interleucina (IL)-2, e *tumor necrosis factor* (TNF)- β . Essas citocinas atuam sobre os macrófagos ativando-os e, portanto, contribuindo para a formação de citocinas inflamatórias, tais como TNF- α , IL-1, IL-6 e a indução de mecanismos efetores citotóxicos dos macrófagos. Por outro lado, as células Th-2 produtoras de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, além de induzirem a produção de anticorpos, também atuam como antagonistas das células Th-1, inibindo a ativação e função dos macrófagos (**Weiss et al, 1998; Weiss, 1999**).

As citocinas derivadas das células Th-1, parecem afetar também a homeostasia do Fe através de diferentes mecanismos (**Weiss, 1999**). Laboratorialmente, pode-se observar uma elevação nos níveis de FS, muitas vezes correlacionados com a atividade da doença, baixas concentrações de Fe sérico e acúmulo de Fe nas células reticuloendoteliais, sugerindo um “desvio” do Fe aos locais de estoque, sem a proporcional transferência do Fe ao plasma (**Denz et al, 1992**).

A ativação dos macrófagos em processos infecciosos ou inflamatórios crônicos provoca uma captação do Fe circulante e incorporação do mesmo aos locais de estoque, sob a forma de ferritina. Vários estudos tem comprovado a associação entre a ativação dos macrófagos, metabolismo do ferro e a anemia em pacientes com doença crônica. Assim, foi observada correlação inversa entre níveis de neopterina e hemoglobina (Hb) e correlação positiva entre níveis de neopterina e concentrações de FS (**Weiss et al, 1995**). Pacientes com vários tipos de tumores e com infecção pelo HIV mostraram correlação inversa entre níveis de Hb e neopterina, entre Hb e IFN- γ e correlação direta entre neopterina e EPO (**Fuchs et al, 1994**). Níveis elevados de neopterina correlacionaram-se com baixos valores de Fe sérico, em pacientes com diversas doenças malignas (**Denz et al, 1992**).

Assim, citocinas pró-inflamatórias e neopterina parecem causar hipoferremia através da indução da síntese de ferritina e estocagem do Fe nos macrófagos e hepatócitos (**Weiss, 1999**).

A neopterina (6-D-eritro-trihidroxipropilpterin) é um composto derivado biossinteticamente da guanosino trifosfato (GTP), e é produzida por macrófagos estimulados pelo IFN- γ liberado pelas células-T ativadas (**Fuchs et al, 1991**).

Níveis elevados de neopterina representam grande ativação da imunidade mediada por células. Deste modo, a determinação da concentração de neopterina tem sido utilizada no estadiamento e no prognóstico de tumores (**Denz et al, 1992**), no monitoramento de doenças auto-imunes (**Wachter et al, 1989**) e na evolução e estadiamento de doenças infecciosas e parasitárias (**Fuchs et al, 1991; Grotto et al, 1994**).

Na infecção pelo HIV os valores de neopterina estão inversamente correlacionados com os índices da relação CD4/CD8 e a progressão da doença é precedida pela elevação dos níveis de neopterina (**Fuchs et al, 1988; Melmed et al, 1989**).

Em pacientes com neoplasia hematológica e doenças inflamatórias crônicas foi observada uma correlação inversa significativa entre níveis de Hb e concentrações de IFN- γ e neopterina, o que fala a favor do envolvimento das citocinas e do sistema imune na patogênese da anemia (Fuchs et al, 1991).

É proposto um possível papel da 7,8-dihidroneopterina na infecção pelo HIV, que está esquematizado na **figura 5**. A ativação da imunidade mediada por célula está associada com o aumento da concentração do IFN- γ , induzindo à expressão do TNF- α e à secreção de radicais livres pelo macrófago. Esses radicais ativam o gene que induz a replicação do HIV. Além disso, ocorre a secreção de neopterina e 7,8-dihidroneopterina pelo macrófago ativado pelo IFN- γ . A 7,8-dihidroneopterina pode agir sinergicamente com o TNF- α na indução da expressão do gene HIV-1 devido ao “stress” oxidativo e a ativação do *nuclear factor-kB*, elemento “enhancer” do promotor da região de LTR do HIV (Baier-Bitterlich et al, 1996).

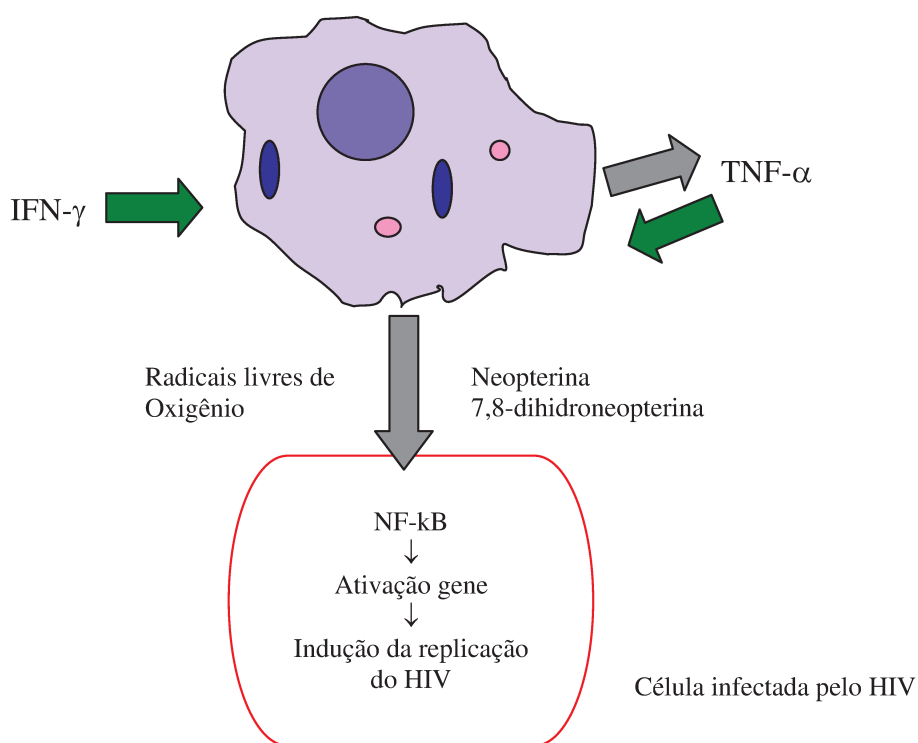


Figura 5: Efeito da 7,8-dihidroneopterina na replicação do HIV. Adaptado de Baier-Bitterlich et al, 1996.

7.3. PAPEL DAS CITOCINAS NA INIBIÇÃO DA ERITROPOIESE: TNF- α , IL-1, IFN- γ , IL-6, IL-2

A formação e o desenvolvimento de várias células sangüíneas é regulada pelos fatores de crescimento hematopoiéticos. Estes fatores hematopoiéticos são os responsáveis pela proliferação, diferenciação e função das células sangüíneas, podendo também causar efeitos pleiotrópicos em outros tipos de células (**Bondurant & Koury, 1986; Groopman et al, 1989**).

As citocinas liberadas durante a resposta imune, não somente afetam o metabolismo de Fe, como também exercem efeito inibitório na eritropoiese, por bloquearem a proliferação e diferenciação de células progenitoras eritróides, além de afetarem a resposta à EPO (**Sears, 1992; Weiss et al, 1998**).

TNF- α . O TNF- α exerce uma importante função na resposta imune e na inflamação. Sua concentração pode estar elevada em pacientes com aids e em pacientes com aids-related complex (ARC) (**Lähdevirta et al, 1988**). Foi demonstrado que o TNF- α media a IL-1 induzindo a inibição da eritropoiese “in vivo” (**Furmanski & Johnson, 1990**).

IL-1. A IL-1 é produzida pelos macrófagos estimulados pelo INF- γ e suprime os progenitores eritróides refletindo, perifericamente, numa queda de 25% no número de RTC após 24 horas da sua administração. A liberação de IL-1 contribui para a alteração no aproveitamento do Fe, já que ao agir sobre os neutrófilos, estimula a liberação de lactoferrina por seus grânulos específicos. A lactoferrina tem maior afinidade pelo Fe do que a Tf, ligando-se à ele e transportando-o aos macrófagos, na forma de ferritina e hemossiderina (**Abshire, 1996**).

Níveis de IL-1 estão elevados em pacientes com artrite reumatóide, assim como em outras infecções associadas com ADC (**Eastgate et al, 1988; Maury et al, 1998**), e esta elevação está correlacionada com os marcadores da atividade da doença e com o grau da anemia (**Kaushansky et al, 1988; Means & Krantz, 1992**).

IFN- γ . O IFN- γ é produzido principalmente pelos linfócitos-T, estando envolvido na modulação das respostas inflamatória e imune, assim como na defesa do hospedeiro contra ataques microbianos (Murray, 1988).

Se o efeito inibitório do IFN- γ sobre a formação de colônias eritróides é direto ou mediado por células acessórias não está de todo elucidado (Means & Krantz, 1992).

IL-6. A IL-6 é produzida por linfócitos e macrófagos, estando envolvida na inibição da *Erythroid-Colony Forming Units* (CFU-E), participando, assim no desenvolvimento da ADC. (Needleman et al, 1992).

Vreugdenhil e colaboradores (1990) observaram níveis elevados de IL-6 em pacientes com artrite reumatóide associadas com ADC, assim como em pacientes sem anemia, sugerindo que a IL-6 estaria mais relacionada com a atividade da doença do que com o grau de anemia.

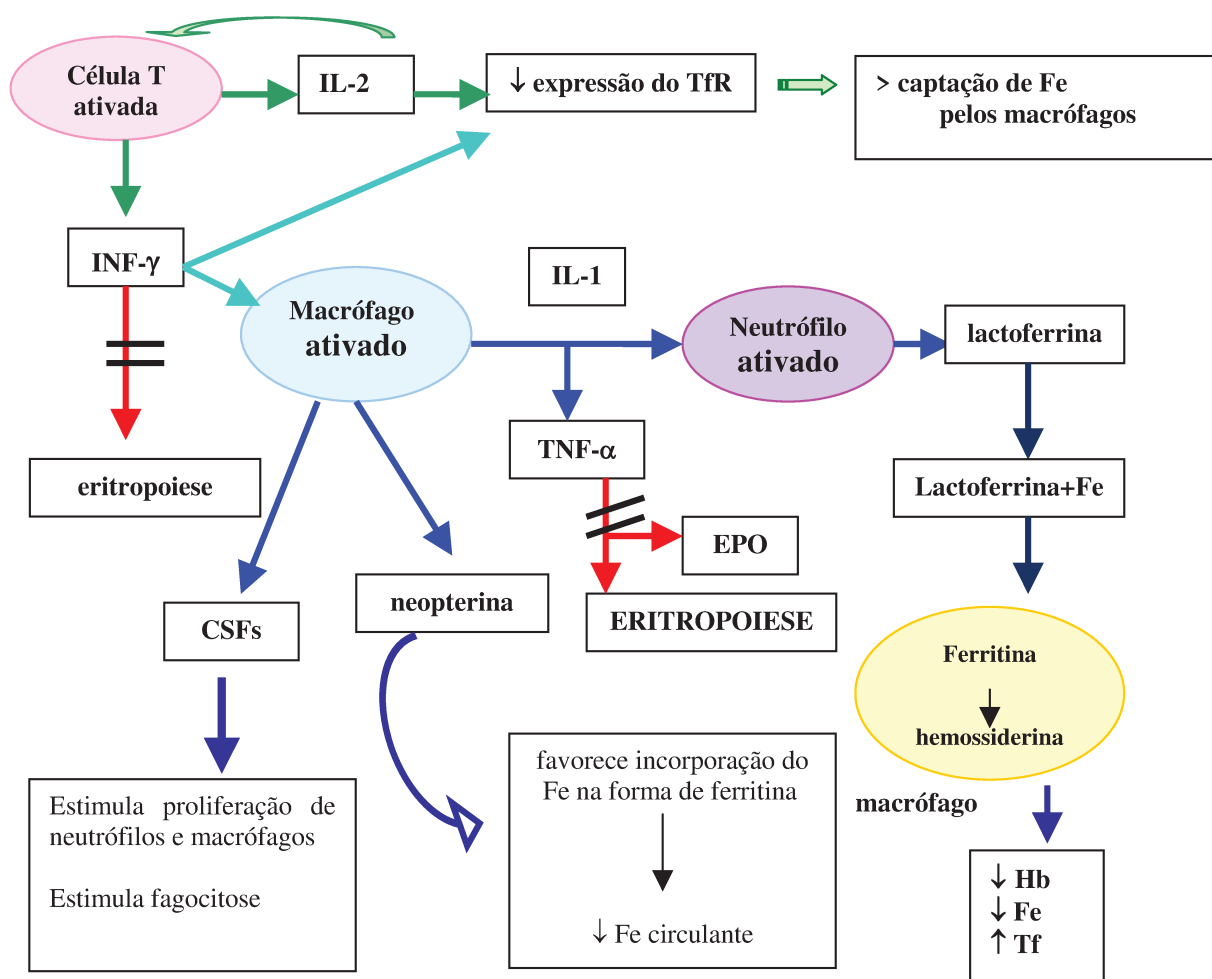
A IL-6 aumenta a síntese de ferritina e induz a captação do Fe, principalmente pelos hepatócitos (Weiss et al, 1995).

IL-2. A IL-2 é produzida pelas células T CD4⁺ e em menor quantidade pelas células T CD8⁺. É a citocina responsável pela progressão do linfócito-T da fase G1 para a fase S do ciclo celular, daí ser originalmente conhecida como *T-cell growth factor* (TCGF) (Abbas et al, 2000).

A IL-2 regula também a atividade citolítica de células *Natural Killer* (NK) e induz, indiretamente, a síntese de IL-1, IL-6 e TNF- α , através do estímulo de síntese do IFN- γ pelas células mononucleares do sangue periférico. Age sinergicamente com a IL-12, induzindo a secreção de IFN- γ pelas células NK. Sobre as células B, age tanto como um *cell growth factor* (CGF), como estimula a síntese de anticorpos (Faquin et al, 1992).

Os efeitos das citocinas inflamatórias IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TGF- β e TNF- α sobre a produção de EPO foram estudados em células Hep3B. Foi observado que, com exceção da IL-6, as demais inibem a produção de EPO induzida por hipóxia (Faquin et al, 1992). A EPO é uma hormônio glicoprotéico endógeno produzido, principalmente, pelos rins (Bondurant & Koury, 1986) e, induz a proliferação e hemoglobinizacão das células progenitoras eritróides (Eschbach et al, 1987).

A **Figura 6** representa a sinergia de diversas citocinas na patogênese da ADC. Durante a ativação imune, há uma indução em cadeia, iniciando-se com a secreção de IFN- γ e IL-2 pelas células-T ativadas. A IL-2 estimula a proliferação clonal de células-T, amplifica a síntese de IFN- γ pelas células-T ativadas e diminui a expressão de *receptors transferrin* (TfR) contribuindo para uma elevação na captação de Fe pelos macrófagos. O IFN- γ , ativando os macrófagos, aumenta a secreção de CSFs, esses estimulam a proliferação de populações granulocíticas e macrofágicas. Por outro lado, INF- γ , TNF- α , neoptertina e IL-1 vão atuar inversamente sobre a formação das células eritróides inibindo a eritropoiese, além de agir no metabolismo de Fe (**Fuchs et al, 1991**).



Figuras 6: Ação de citocinas sobre a eritropoiese e metabolismo do Fe na fisiopatologia da ADC

8. TfR: DESCRIÇÃO; FUNÇÃO NO METABOLISMO DO FERRO; E PARTICIPAÇÃO NO PROCESSO DE ATIVAÇÃO DE CÉLULA-T

O estudo do comportamento do TfR torna-se especialmente interessante, porque permite a análise da correlação entre a ativação do sistema imune, o metabolismo do ferro e a avaliação da eritropoiese (Beguin, 1992).

O TfR está presente, praticamente, em todas as células do organismo, mas principalmente nos precursores eritróides, células da placenta e fígado. Trata-se de uma glicoproteína de aproximadamente 95000 daltons, composta de dois monômeros ligados por pontes de dissulfeto, possuindo um domínio citoplasmático (intracelular) de 61 aminoácidos (aa), um segmento transmembrana de 28 aa e um segmento extracelular com 671 resíduos (Figura 7). Cada receptor pode se ligar a 1 ou 2 moléculas de Tf que, após a invaginação da membrana e formação da vesícula endocítica acidificada promove a liberação do Fe. A apotransferrina retorna à superfície celular, enquanto o Fe liberado no citoplasma será utilizado pela célula (Figura 8) (Beguin, 1992).

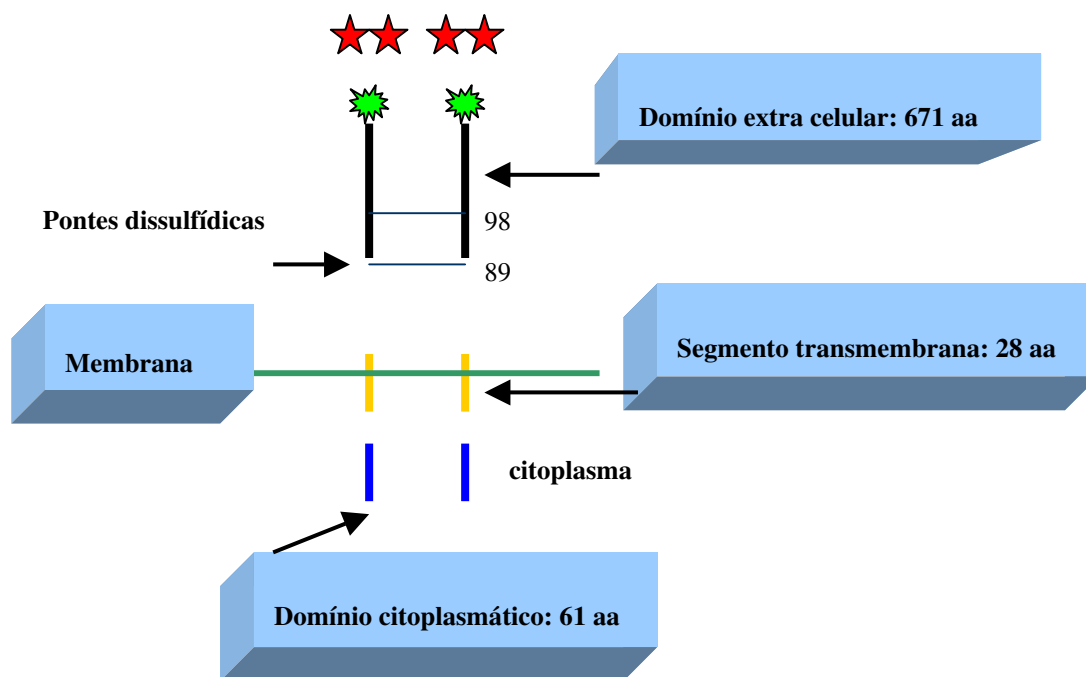


Figura 7: Representação da estrutura do TfR.

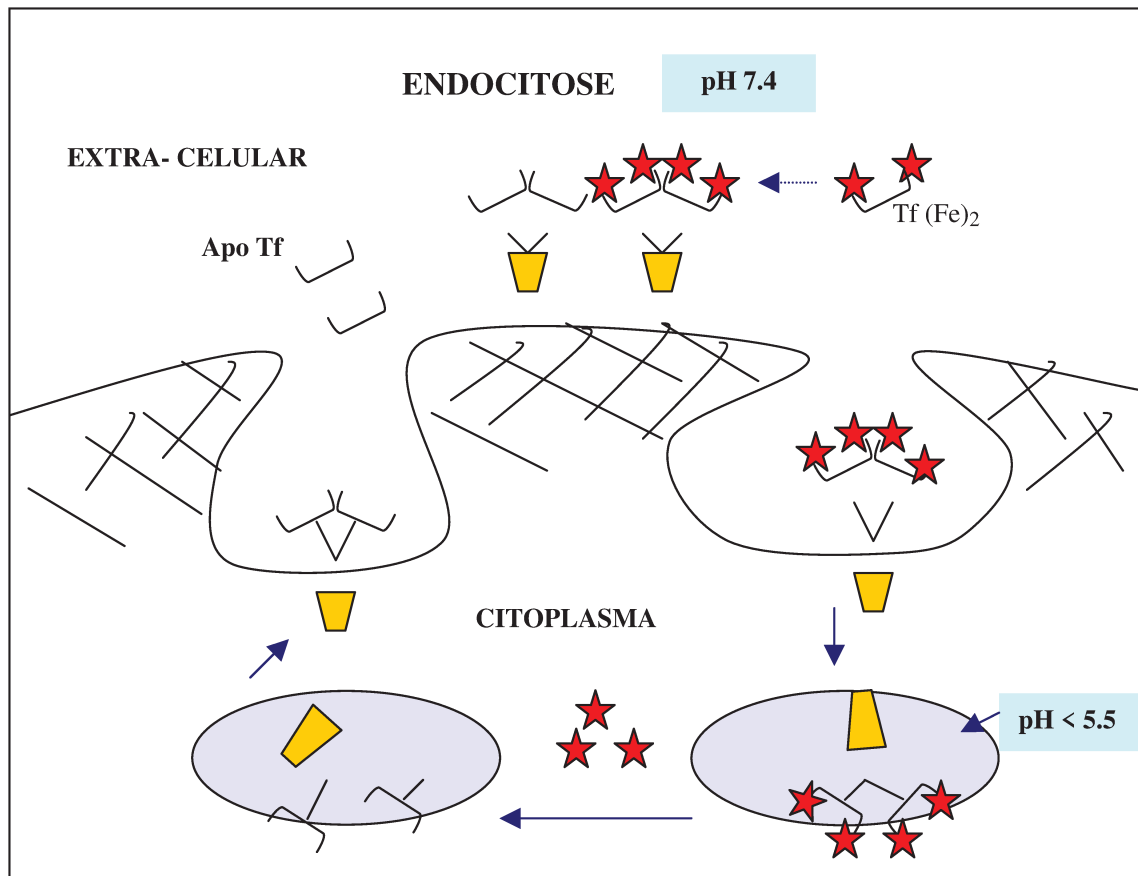


Figura 8: Esquema representativo do transporte do ferro pela transferrina, processo de endocitose e liberação do ferro.

A forma solúvel do TfR (sTfR) foi evidenciada no plasma humano e parece corresponder à forma truncada do receptor tecidual, provavelmente derivado de clivagem proteolítica do domínio extracelular (Skikne, 1998).

Concentrações diminuídas de sTfR são observadas nas situações de decréscimo da eritropoiese, como na anemia aplástica, quimioterapia ou insuficiência renal crônica, enquanto valores elevados são descritos quando há expansão da eritropoiese, como nas anemias hemolíticas. A expressão dos TfR nas células está relacionada com a disponibilidade de Fe. A deficiência de Fe resulta em rápida indução da síntese de

receptores, enquanto o excesso de Fe suprime o número dos mesmos. Na anemia que acompanha processos inflamatórios o número de receptores não é alterado, o que torna a determinação do sTfR um método útil para distinguir ADC de anemia ferropriva, diagnóstico diferencial por vezes difícil de ser feito (**Ferguson et al, 1992; Abshire, 1996**).

Há três hipóteses que podem explicar a relação entre TfR e o sistema imune: **1)** a secreção de IL-2 pode inibir a transcrição do gene do TfR; **2)** a IL-2 secretada pelas células-T ativadas, agindo sobre as mesmas, amplificam a síntese do INF- γ , estimulando a captura do Fe da circulação, estocando-o sob a forma de ferritina, podendo levar à uma diminuição do Fe que, por sua vez, regula a síntese de TfR; **3)** a ativação do sistema imune pode estar acompanhada de uma alta captação de Fe pelos linfócitos que utilizam o Fe para a síntese de DNA (**Neckers & Cossman, 1983; Kemp, 1993; Pelosi-Testa et al, 1998**).

Por utilizar metodologia bem estabelecida e simples, a quantificação do sTfR tem sido proposta como substituta dos métodos ferrocinéticos na monitorização da eritropoiese (**Beguin, 1992**).

A maior fonte dos TfR séricos são os precursores eritróides imaturos da medula óssea e os RTC circulantes. Durante o processo de maturação dos RTC, há um decréscimo progressivo na densidade dos receptores de Tf de membrana, acompanhando a queda na capacidade de síntese de Hb desde o RTC mais imaturo até a hemácia (**Corberand, 1996**).

9. RETICULÓCITO (RTC)

O RTC é formado após o eritroblasto ortocromático expulsar seu núcleo. Restos de RNA ribossomal permanecem no interior da célula por cerca de 3,5 a 4 dias. Durante esse período, ainda na medula óssea, ocorre a maturação da célula, que prossegue nas 24 horas seguintes, quando o RTC permanece na circulação onde se transforma em eritrócito maduro.

A avaliação de RTC imaturos tem sido proposta como um possível indicador de atividade eritropoiética na medula óssea (**Davis et al, 1995; Corberand, 1996; Dalal et al, 1996**).

O reconhecimento do *Mean fluorescence index* (MFI) e das diferentes frações de maturidade dos RTC, através de metodologia de fluorescência e citometria de fluxo, possibilitou a introdução de novos parâmetros laboratoriais na investigação de doenças que afetam a produção da medula óssea, auxiliando no diagnóstico diferencial entre as anemias regenerativas e não regenerativas (**Tsuda & Tatsumi, 1989**); na avaliação da recuperação medular pós-transplante (**Davies et al, 1992; Dalal et al, 1996; Grotto et al, 1999**) ou quimioterapia (**Kuse, 1993**) e servindo como indicador dos casos de anemia potencialmente responsivos à terapia com EPO (**Macdougall et al, 1992**).

O índice de maturidade dos RTC (IMR) corresponde ao MFI, e é derivado da análise citométrica de fluxo, dependendo da intensidade da fluorescência obtida. A correlação entre os valores de MFI, níveis de EPO e TfR sugere ser o MFI um indicador válido da atividade eritropoiética da medula (**Bowen et al, 1994; Davis et al, 1995; Testa et al, 1997**).

Portanto, quando a medula óssea é responsiva e tem capacidade regenerativa, novos RTC serão lançados na circulação, elevando a porcentagem de células mais imaturas que possuem maior quantidade de TfR na sua membrana. Até o momento, não existem dados na literatura sobre o comportamento do TfR na ADC em pacientes HIV positivo, e sua possível relação com os níveis de RTC e suas frações como indicadores da atividade medular provavelmente afetada pela ação de diversas citocinas inibitórias da eritropoiese.



OBJETIVOS

GERAL

Estudar diversos aspectos relacionados à hematopoiese em pacientes com aids. Através dessa análise inicial, selecionar um grupo de pacientes com ADC, afim de avaliar a associação entre os aspectos hematológicos, alterações do metabolismo do ferro e a associação com os níveis de IFN γ .

ESPECÍFICOS

1. Identificar as principais alterações hematológicas em um grupo de pacientes HIV positivo, dando ênfase às anormalidades da série vermelha e observá-las quanto ao estágio da doença.
2. Caracterizar os tipos de anemia existentes num grupo de pacientes infectados pelo HIV em diferentes estágios clínicos da doença, através de um protocolo de exames laboratoriais por nós estabelecido.
3. Selecionar um grupo de pacientes HIV positivo com diagnóstico de ADC e analisar aspectos relacionados com o metabolismo do ferro, atividade eritropoiética e a associação com os níveis de IFN- γ , comparando-os com um grupo de pacientes HIV positivo sem anemia.



*CASUÍSTICA E
METODOLOGIA*

CASUÍSTICA

PACIENTES

No período de Dezembro de 1999 à Fevereiro de 2001, foram selecionados 111 pacientes com sorologia positiva para HIV-1 sendo 75,7% do sexo masculino e 24,3% do sexo feminino, com média de idade de 34,4 (SD+/- 7,3) anos.

Os pacientes foram acompanhados pelo ambulatório e enfermaria de Moléstias Infecciosas do Hospital das Clínicas da UNICAMP. Todos os participantes foram informados quanto aos objetivos e riscos do procedimento e deram seu livre consentimento por escrito para serem incluídos no estudo (Anexo 1). Este tipo de estudo é considerado de risco mínimo para os pacientes, conforme definição da resolução 01/88 do Conselho Nacional de Saúde e recebeu parecer favorável da Comissão de Ética Médica da FCM/UNICAMP.

Uso de medicação: com exceção de 3 pacientes sem anemia, todos os demais faziam uso de medicação anti-retroviral e/ou contra infecções oportunistas, de acordo com os critérios e protocolos estabelecidos pela Disciplina de Moléstias Infecciosas da FCM/UNICAMP.

Foi selecionado, também, um grupo de 11 indivíduos sadios afim de validar os kits. Os valores de normalidade por nós utilizados, referem-se aos valores de referência dos kits utilizados no laboratório de Patologia Clínica do HC/UNICAMP.

METODOLOGIA

Classificação clínica: de acordo com o sistema proposto pelo CDC, os pacientes foram classificados nas diferentes categorias clínicas (**Tabela 2**).

Tabela 2: Classificação do CDC dos pacientes HIV⁺ nas diferentes categorias clínicas.

	CLASSIFICAÇÃO do CDC								
	SUBCATEGORIAS CLÍNICAS								
	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3
PACIENTES HIV positivo (n)	15	12	07	01	04	05	00	4	63
TOTAL	111								

1. Diagnóstico Sorológico

1.1. Teste para HIV-1/2 gO: ensaio imunoenzimático de micropartículas (MEIA) para a detecção qualitativa de anticorpos para HIV tipo 1 (grupos M e O) e/ou tipo 2 (HIV-1/HIV-2), kit HIV1/2 gO, AXSYM® system/ABBOTT (USA). Aparelho Axsym System/ABBOTT (Alemanha).

1.2. ELISA para HIV-1 e HIV-2: ensaio imunoenzimático; kit Cobas® Core Anti HIV-1/HIV-2 EIA DAGS, Roche Diagnostics (Suíça). Aparelho Cobas Core (Método automático) (Alemanha).

1.3. Western Blot: kit Qualicode HIV1/2, Immunetics® (USA).

1.4. Contagem de linfócitos T CD4 e CD8: kit FACS Count™ Reagentes, Becton Dickinson (USA). Aparelho FACS Count System, patenteado pela Becton Dickinson (USA).

- Esses exames foram realizados no laboratório de aids- HC/UNICAMP.
- Os exames descritos a seguir, excetuando o teste de Coombs e análise da medula óssea (HEMOCENTRO/UNICAMP), foram realizados na Divisão de Patologia Clínica/HC/UNICAMP.

2. Diagnóstico da Anemia – Perfil Hematológico

2.1. Hemograma completo e Contagem de Reticulócitos: o sangue periférico foi coletado em tubo contendo EDTA como anticoagulante. As contagens global e diferencial foram realizadas em aparelho automatizado (Pentra 120 Retic/ABX – Horiba / França).

A contagem diferencial de leucócitos e a análise do esfregaço de sangue periférico para a confirmação e caracterização das anormalidades foram realizadas em lâminas coradas com Leishman / Merck® (USA) e observadas à microscopia.

A contagem de RTC foi feita através de citometria de fluxo, usando Thiazole orange como marcador fluorescente de RNA, no equipamento Pentra 120 Retic. Os parâmetros analisados foram: a contagem de RTC em números absolutos e o índice médio de fluorescência (MFI), como indicador do grau de imaturidade do RTC.

3. Avaliação do Estado do Ferro

3.1. Dosagem de ferro sérico (Fe sérico): ensaio colorimétrico com a Ferrozina[®]/Ácido ascórbico; kit Unimate 5 Iron/ Roche Diagnostics, (USA), usando o aparelho Hitachi – 917 (Automatic Analyzer) / Roche (Alemanha).

3.2. Determinação da ferritina sérica (FS): ensaio imunonefelométrico; kit N Latex ferritina, Dade Behring (USA), usando o Nefelômetro Behring (BNII) (Alemanha).

3.3. Capacidade Total de Fixação do Ferro (TIBC): determinação direta com Ferrozina[®]; kit Unimate 7 UIBC, Roche Diagnostics, (USA), usando o aparelho Cobas Mira Plus, Roche (Alemanha).

3.4. Determinação do sTfR: ensaio imunonefelométrico; kit N Latex sTfR, Dade Behring (USA), usando o Nefelômetro Behring (BNII) (Alemanha).

3.5. Determinação da transferrina (Tf): ensaio imunonefelométrico; kit N Anti-soros contra Transferrina, Dade Behring (USA), usando o Nefelômetro Behring (BNII) (Alemanha).

3.6. Relação sTfR/log FS (Beguin, 1992).

4. Avaliação da deficiência de Vitamina B12 e Ácido fólico

4.1. Dosagem de Vitamina B12: por eletroquimioluminescência; Kit Vitamina B12, Roche (USA), usando o aparelho Elecsy® 2010 – Hitachi / Roche (Alemanha).

4.2. Dosagem de Ácido fólico: por eletroquimioluminescência; Kit Ácido Fólico, Roche (USA), usando o aparelho Elecsy® 2010 – Hitachi / Roche (Alemanha).

5. Determinação de INF- γ : ensaio imunoenzimático; kit human IFN- γ , Quantikine® ELISA/R&D Systems, (USA). Aparelho de leitura SLT Spectra (USA).

6. Avaliação do Perfil Hepático

6.1. Determinação da Alanina Aminotransferase (ALT): teste enzimático colorimétrico; kit ALT, Roche®, (USA). Aparelho Hitachi-917 (Automatic Analyzer)/ Roche (Alemanha).

6.2. Determinação da Aspartato Aminotransferase (AST): teste enzimático colorimétrico; kit AST, Roche®, (USA). Aparelho Hitachi-917 (Automatic Analyzer)/Roche, (Alemanha).

6.3. Determinação da Fosfatase Alcalina (ALP): teste enzimático colorimétrico; kit ALP, Roche®, (USA). Aparelho Hitachi-917 (Automatic Analyzer)/ Roche, (Alemanha).

6.4. Determinação da Gamma-Glutamiltransferase(GGT): teste enzimático colorimétrico; kit GGT, Roche®, (USA). Aparelho Hitachi-917 (Automatic Analyzer)/ Roche, (Alemanha).

7. Determinação da EPO: ensaio de quimioluminescência; kit Immulite Epo, Immulite[®]/DPC, (Reino Unido). Aparelho Immulite, Immulite[®]/DPC (USA).

8. Avaliação de anemia hemolítica

8.1. Concentração de Bilirrubina indireta: ensaio colorimétrico; kit Bilirrubina, Roche (USA). Aparelho Hitachi-917 (Automatic Analyzer)/ Roche, (Alemanha).

8.2. Determinação da *lactate dehydrogenase*(LDH): ensaio cinético-UV; kit Dehidrogenase láctica, Roche[®](USA). Aparelho Hitachi-917 (Automatic Analyzer)/ Roche, (Alemanha).

8.3. Dosagem de haptoglobina: ensaio nefelométrico; kit Hpt- Haptoglobina; Beckman-Coulter (Irlanda). Aparelho Beckman-Coulter (Irlanda).

9. Investigação de hemoglobinopatias

9.1. Eletroforese de hemoglobina: eletroforese de hemoglobina em acetato de celulose usando tampão TRIS – EDTA – BORATO, pH=8,9 (Dacie & Lewis, 1996; Weatherall & Clegg, 1981).

9.2. Dosagem de Hb A₂: método de eluição (Weatherall & Clegg, 1981).

10. Exame da Medula óssea (MO) - aspirado e biópsia de MO: só foram analisados os resultados já existentes no prontuário dos pacientes.

Valores de referência:

Na **tabela 03** constam os resultados das várias provas laboratoriais realizadas em material proveniente de 11 indivíduos sadios e os valores de referência da literatura (utilizado em nosso laboratório) ou sugerida pelos fabricantes dos kits.

Tabela 3: Valores de referência do grupo normal e os valores de referência dos kits.

n / S	Hb	Ht	VCM	HCM	RBC	WBC	PLT	RTC	Fe sérico	TIBC	FS	Tf	sTfR	EPO	AST	ALT	GGT	ALP	MFI	IFN- γ
	g/dl	%	fl	pg	$\times 10^9/l$	$\times 10^9/l$	$\times 10^9/l$	$\times 10^9/l$	$\mu g/dl$	$\mu g/dl$	ng/ml	g/l	mg/l	mU/ml	UI/l	UI/l	UI/l	UI/l	%	pg/ml
1 M	17,2	50	86	30	5,8	5,9	215	50,9	150	230	45	2,8	1	9,6	27	12	28	233	8,4	6,1
2 F	14,3	40	91	32	4,4	5,5	174	43,1	88	302	70	3	1,5	10,6	18	11	14	120	12,6	2,1
3 F	14,1	41	90	31	4,5	8,6	348	66,4	70	390	85	2,5	1,63	7,6	19	11	12	99	20,1	2,1
4 F	13,5	39	94	33	4,0	7,1	202	71,3	120	380	77	2,7	1,2	5,1	16	11	11	115	15,9	2,3
5 M	14,7	44	84	28	5,2	5,2	221	63,4	96	284	49	2,3	0,99	8,5	31	21	20	214	10,2	2,4
6 M	15,6	45	84	29	5,0	4,1	152	84,1	125	377	52	3,2	1,3	6,0	33	41	37	161	16,3	6,8
7 M	15,6	46	89	30	5,2	6,9	205	57,7	132	408	106	3,1	1,5	3,5	23	22	28	173	14,4	5,4
8 M	15,7	46	87	30	5,3	6,5	236	84,4	99	323	91	2,7	0,95	8,0	27	35	17	178	17,3	5,7
9 F	12,4	37	90	31	4,2	7,4	187	42	103	307	33	2,8	1,14	8,2	13	7	13	105	12,6	2,4
10 F	13,	37	89	31	4,2	4,3	225	47,7	76	253	43	2,1	0,9	7,0	12	6	10	142	10,5	7,5
11 F	13,6	40	81	27,4	4,9	5,4	150	53,5	115	330	67	3,4	1,68	7,8	18	13	11	107	11,2	2,0
H	14-18	42-52	80-96	27-32	4,5-6,1	4-10	150-400	27-135	53-167	150-400	20-280	2-3,6	0,83-1,76	2,6-34	10-35	10-45	10-35	65-300	6,4-25,5	<15,6
M	12-16	37-47	81-99	27-32	4,2-5,4	4-10	150-400	27-135	49-151	150-400	10-140	2-3,6	0,83-1,76	2,6-34	10-35	10-45	7-30	65-300	6,4-25,5	<15,6

n | S, número de pacientes | sexo; Hb, hemoglobina; Ht, hematócrito; VCM, volume corpuscular médio; HCM, hemoglobina corpuscular média; RBC, contagem de eritrócitos; WBC, contagem de leucócitos; PLT, contagem de plaquetas; RTC, contagem de reticulócitos; Fe sérico, ferro sérico; TIBC, capacidade total de fixação do ferro à transferrina; FS, ferritina sérica; Tf, transferrina; sTfR, receptor solúvel de transferrina ; EPO, eritropoietina; AST, aspartato aminotransferase; ALT, alanina aminotransferase; ALP, fosfatase alcalina; MFI, índice de fluorescência média; IFN- γ , interferon-gamma.

*Algumas siglas referentes aos parâmetros laboratoriais estão em inglês, porém a sua explicação na legenda está em português.

A partir dos dados obtidos do hemograma, pacientes masculinos apresentando Hb<14g/dl e femininos Hb<12g/dl foram subdivididos em 3 sub tipos morfológicos de anemia, de acordo com os valores do volume corpuscular médio dos eritrócitos (VCM) e hemoglobina corpuscular média (HCM), em :

- 1- anemia microcítica-hipocrômica
- 2- anemia macrocítica-hipercrômica
- 3- anemia normocítica-normocrômica

Em seguida procedeu-se à investigação laboratorial demonstrada na **Figura 09**, onde consta a sequência de exames propostos para um possível diagnóstico das diferentes anemias.

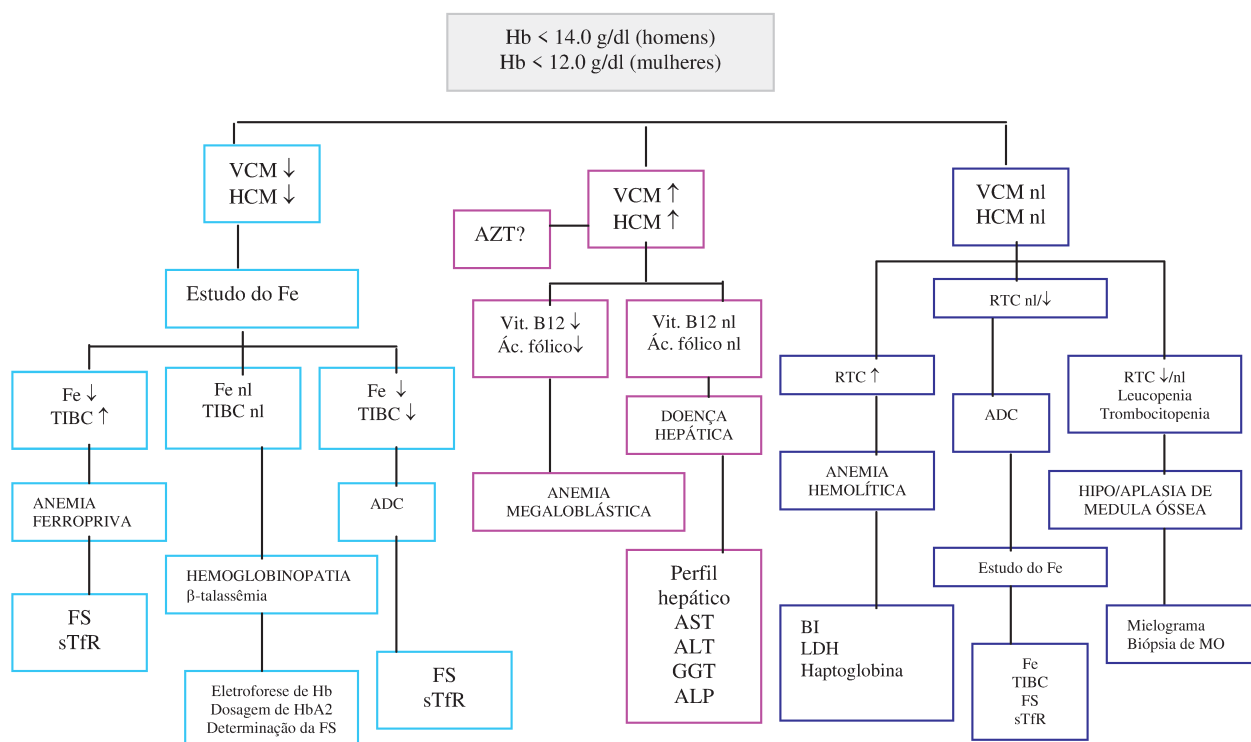


Figura 9: Protocolo de Investigação das Anemias em Pacientes HIV positivo.

11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A caracterização dos grupos estudados foi feita através de análise descritiva, medidas de posição e dispersão. Para comparação de proporções foi utilizado o teste qui-quadrado.

Para comparação de variáveis contínuas entre dois grupos foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Para verificar a correlação entre as variáveis foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$ (5%).



RESULTADOS

1. Alterações Hematológicas / Caracterização dos Tipos de Anemia

Dos 111 pacientes estudados, 42 (37,8%) não apresentaram anemia, sendo 36% correspondentes ao sexo feminino e 64% ao sexo masculino. Dos 69 pacientes com anemia (62,2%), 17,4% eram do sexo feminino e 82,6% do sexo masculino (**Tabela 4**).

Tabela 4: Classificação dos pacientes estudados em relação à presença ou ausência de anemia, e porcentagem em relação ao sexo.

	PACIENTES ANÊMICOS n (%)	PACIENTES NÃO ANÊMICOS n (%)
111 Pacientes Estudados	69 (62,2%)	42 (37,8%)
Sexo Feminino	12 (17,4%)	15 (36%)
Sexo Masculino	57 (82,6%)	27 (64%)

Inicialmente, de acordo com os resultados da hematimetria foi feita uma classificação morfológica das anemias. Em seguida, de acordo com os exames do protocolo adotado (**Figura 09**), foram sugeridas as possíveis causas das anemias.

Assim, dentre os 69 pacientes, 14 (20,2%) apresentaram anemia microcítica e hipocrômica. Desses, 1 paciente apresentava β -talassemia heterozigótica, 6 tinham resultados laboratoriais compatíveis com ADC, 2 tinham anemia ferropriva e 5 não puderam ser classificados com os exames propostos no protocolo adotado.

Vinte e dois (31,8%) pacientes foram subclassificados como tendo anemia macrocítica e hiperocrômica, sendo que 2 pacientes tinham anemia megaloblástica, 14 mostraram provas laboratoriais sugestivas de doença hepática, 2 tinham ADC e 4 não foram classificados. Trinta e três pacientes (47,8% dos casos de anemia) foram subclassificados como tendo anemia normocítica e normocrômica, sendo que 9 pacientes apresentaram exames compatíveis com ADC, 1 apresentou ADC mais hipo/aplasia de medula óssea (confirmado por biópsia) e 1 ADC sugestivo de hipo/aplasia, 4 pacientes sugestivos de hipo/aplasia e 2 com hipo/aplasia de medula confirmado por biópsia, e 16 não foram classificados.

Vinte e cinco pacientes com anemia não puderam ser classificados, de acordo com o nosso protocolo, perfazendo um total de 22,5% de todos os casos de anemia.

Os resultados laboratoriais de todos os pacientes, separados pelos diferentes grupos de anemia estão apresentados no **Anexo 2**.

Tabela 5: Tipos de anemias diagnosticadas a partir do protocolo laboratorial proposto.

CLASSIFICAÇÃO MORFOLÓGICA INICIAL		
VCM↓ e HCM↓	VCM ↑ e HCM ↑/ nl	VCM nl e HCM nl
Anemia Microcítica e Hipocrômica n=14 (20,2%)	Anemia Macroscítica e Hiperocrômica n=22 (31,8%)	Anemia Normocítica e Normocrômica n=33 (47,8%)
♦ β-talassêmico =1	♦ Anemia megaloblástica =2	♦ ADC=11
♦ Anemia ferropriva=2	1 – Doença hepática*	1 – sugestivo de hipo/aplasia
♦ ADC=6	♦ Doença hepática*=14	1 – hipo/aplasia
1 – sugestivo de hipo/aplasia	2 – sugestivo de hipo/aplasia	♦ Sugestivo de hipo/aplasia=4
♦ Não Classificáveis●=5	♦ ADC=2	♦ Hipo/aplasia=2
	1 – sugestivo de hipo/aplasia	♦ Não Classificáveis●=16
	♦ Não Classificáveis●=4	8 – doença hepática

* - Cirrose hepática alcoólica; hepatite; drogas anti-retrovirais, como por exemplo: DDI, AZT, Saquinavir, etc.

●- Não se enquadraram às hipóteses diagnósticas do protocolo laboratorial.

Dos 69 pacientes com anemia, 19 deles (27,5%) tiveram resultados laboratoriais sugestivos de ADC, independente do tipo morfológico da anemia. Considerando somente o grupo de pacientes cujos exames laboratoriais permitiram a sugestão de um diagnóstico para a anemia (44 pacientes dos 69 com anemia), 43,2%, quase metade deles, teve como possível etiologia para a anemia a ADC. A **Tabela 6** apresenta os dados hematológicos e dados do metabolismo de ferro desses pacientes

Além das alterações da série vermelha, foram observadas outras anormalidades hematológicas, em relação às contagens de plaquetas, leucócitos, linfócitos, neutrófilos e RTC nos 111 pacientes estudados. A **Figura 10** e a **Tabela 7** mostram as alterações observadas nos grupos com anemia (n= 69) e sem anemia (n= 42). Fica evidente que as

porcentagens de indivíduos com anormalidades em todos os parâmetros analisados é maior no grupo com anemia, embora a diminuição no número de plaquetas, leucócitos totais, linfócitos e neutrófilos seja bastante significativa no grupo sem anemia.

Tabela 6: Dados hematológicos e parâmetros referentes ao metabolismo do ferro em pacientes com ADC.

N	CD	Hb	VCM	HCM	WBC	PLT	RTC#	MFI	Fe	Tf	FS	sTfR	sTfR/ log FS
	C	(g/dl)	(fl)	(pg)	(x10 ⁹ /l)	(x10 ⁹ /l)	(x10 ⁹ /l)	%	(µg/dl)	(g/l)	(ng/ml)	(mg/l)	
VR	H	14-18	80-96	27-32	4,0-10,0	150-300	27-135	6,4-25,5	53-167	2,0-3,6	20-280	0,83-1,76	
VR	M	12-16	81-99	27-32	4,0-10,0	150-300	27-135	6,4-25,5	49-151	2,0-3,6	10-140	0,83-1,76	
1	C3	11,5	80,3	27,8	10,9	267,0	27,2	5,1	48,0	1,3	3760,0	1,2	0,34
2	C3	9,3	72,0	23,2	5,8	458,0	34,0	13,7	19,0	2,3	49,7	1,7	1,0
3	C3	10,5	75,8	25,1	7,8	152,0	34,7	12	50,0	1,2	1070,0	1,1	0,4
4	C3	8,3	78,0	26,3	2,5	157,0	58,4	18,8	29,0	0,8	835,0	1,9	0,65
5	C3	8,4	78,0	26,8	2,5	52,0	15,6	13,6	49,0	0,9	3670,0	0,9	0,36
6	C3	12,5	78,0	26,0	7,6	196,0	25,0	8,8	47,0	2,9	241,0	1,2	0,5
7	C3	7,3	85,3	29,7	3,0	10,0	26,2	15,9	43,0	0,5	1500,0	1,6	0,5
8	C3	8,2	88,6	30,3	3,9	93,0	42,0	15,2	16,0	0,9	7580,0	2,6	0,7
9	A1	13,6	87,0	28,6	5,3	159,0	16,8	2,8	46,0	1,9	285,0	4,8	2,0
10	C3	10,7	85,9	29,7	5,0	123,0	31,6	18,8	22,0	1,4	1320,0	6,6	2,12
11	C3	9,4	92,6	33,3	5,1	316,0	31,9	17,5	20,0	1,5	415,0	0,6	0,23
12	C3	10,9	88,0	29,6	20,1	559,0	36,3	6,7	15,0	0,6	1000,0	1,4	0,46
13	C3	6,1	93,0	30,9	8,4	79,0	63,9	15	46,0	1,6	840,0	1,1	0,4
14	C3	7,9	89,8	30,7	3,4	512,0	44,2	25,2	29,0	0,9	1370,0	2,7	0,87
15	C3	11,0	89,6	30,6	9,2	252,0	84,4	14	44,0	2,0	340,0	1,0	0,4
16	C3	9,2	84,7	31,2	9,96	133,0	41,8	11,2	32,0	1,0	1530,0	2,1	0,65
17	C3	11,7	96,0	32,0	3,1	152,0	28,7	12,7	47,0	1,1	1060,0	1,7	0,56
18	C3	11,5	102	36,7	10,6	317,0	17,8	14	40,0	1,9	238,0	2,1	0,87
19	C3	7,9	107	36,2	3,65	86,0	142,0	17,2	2,0	1,1	629,0	2,3	0,82

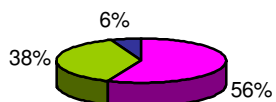
CDC, classificação CDC; Hb, hemoglobina; VCM, volume corpuscular médio; HCM, hemoglobina corpuscular média; WBC, contagem de células brancas; PLT, contagem de plaquetas; RTC#, contagem de reticulócitos absolutos; MFI, índice de fluorescência média; Fe, ferro sérico; Tf, transferrina; FS, ferritina sérica; sTfR, receptor transferrina sérica; sTfR/log FS, relação da concentração do sTfR/log da ferritina; VR valores de referência. *Algumas siglas referentes aos parâmetros laboratoriais estão apresentadas em inglês, mas a sua explicação na legenda está em português.

Tabela 7: Porcentagens de pacientes com e sem anemia que mostraram anormalidade nas contagens de plaquetas, leucócitos, linfócitos, neutrófilos e RTC.

		GRUPO COM	GRUPO SEM
		ANEMIA (n=69)	ANEMIA (n=42)
Nº de PLT (150-400 x 10 ⁹ /l)	N	56 %	67%
	↑	6%	2%
	↓	38%	31%
Nº leucócitos (4,0-10,0 x 10 ⁹ /l)	N	62%	86%
	↑	6%	2%
	↓	32%	12%
Nº de linfócitos (1,5-4,0 x 10 ⁹ /l)	N	22%	17%
	↑	4%	36%
	↓	74%	47%
Nº de neutrófilos (2,1-8,0 x 10 ⁹ /l)	N	32%	46%
	↑	33%	21%
	↓	35%	33%
Nº de RTC (27-135 x 10 ⁹ /l)	N	65%	76%
	↑	3%	**
	↓	32%	24%

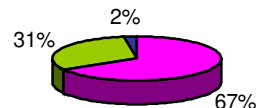
N, normal; ↑, aumento; ↓, diminuição; **, nenhum caso observado. Os valores de referência para as contagens estão apresentados entre parênteses.

Nº de Plaquetas - Pacientes Anêmicos



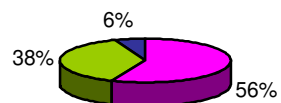
■ normal ■ trombocitopenia ■ trombocitose

Nº de Plaquetas - Pacientes Não Anêmicos



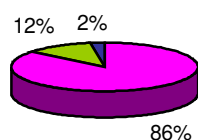
■ normal ■ trombocitopenia ■ trombocitose

Nº de Plaquetas - Pacientes Anêmicos



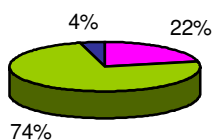
■ normal ■ trombocitopenia ■ trombocitose

Nº de Leucócitos - Pacientes Não Anêmicos



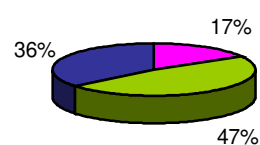
■ normal ■ leucocitopenia ■ leucocitose

Nº de Linfócitos - Pacientes Anêmicos



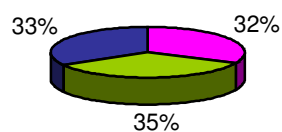
■ normal ■ linfocitopenia ■ linfocitose

Nº de Linfócitos - Pacientes Não Anêmicos



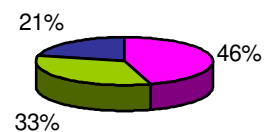
■ normal ■ linfocitopenia ■ linfocitose

Nº de Neutrófilos - Pacientes Anêmicos



■ normal ■ neutropenia ■ neutrofilia

Nº de Neutrófilos- Pacientes Não Anêmicos



■ normal ■ neutropenia ■ neutrofilia



Figura 10: Alterações hematológicas observadas nos grupos com anemia (n= 69) e sem anemia (n= 42)

A concomitância na redução das séries eritrocitária, leucocitária e plaquetária, dos 69 pacientes que apresentaram anemia, foi mais freqüente nos casos de pacientes que apresentaram anemia do tipo normocítica e normocrômica (n=8), seguida de anemia macrocítica e hipercrômica (n=3) e microcítica e hipocrômica (n=1).

2. Classificação CDC e Tipo de Anemia

A grande maioria dos pacientes infectados pelo HIV foi classificada quanto ao estadio da doença na categoria clínica C (n=67), sendo que 63 pacientes pertenciam à categoria clínica C3, portanto com contagem de CD4 < 200 células/mm³ e com algum tipo de infecção associada. Desses, somente 10 indivíduos (15,8%) não tinham evidência laboratorial de anemia.

A segunda categoria clínica mais freqüente foi representada pelo subtipo A, ou seja, pacientes assintomáticos ou com linfadenopatia generalizada persistente (n=34 / 30%). Nesse grupo a maioria dos pacientes (n=24 / 70,5%) não apresentou evidência laboratorial de anemia (**Tabela 8**).

Tabela 8: Classificação do CDC dos pacientes HIV positivo nos diferentes grupos estudados.

Grupos	Classificação CDC								
	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3
Anemia microcítica e hipocrômica	0	0	1	0	0	1	0	1	11
Anemia macrocítica e hipercrômica	1	1	0	0	0	1	0	1	18
Anemia normocítica e normocrômica	5	2	0	0	2	0	0	0	24
HIV positivo sem anemia	9	9	6	1	2	3	0	2	10
n	15	12	7	1	4	5	0	4	63
	34			10			67		
Total	111 pacientes								

A: assintomático para HIV e LGP

B: sintomático agudo (primário), não A nem C

C: aids– categorias de CD4: 1($\geq 500/\text{mm}^3$); 2(200-499/ mm^3); 3(< 200/ mm^3).

3. Pacientes com resultados sugestivos de acúmulo de ferro

Considerando os níveis de FS como indicadores do estoque de Fe, foi observado que no grupo de pacientes com anemia microcítica e hipocrômica (n= 14), excetuando aqueles com hemoglobinopatia (n= 1), anemia ferropriva (n= 2) e ADC (n= 6), dos 5 restantes, 4 deles mostraram níveis elevados de FS. No grupo com anemia macrocítica e hipercrômica (n= 22), excetuando aqueles com anemia megaloblástica (n= 2) e com ADC (n= 2), dos 18 restantes, 16 apresentaram FS elevada. E no grupo com anemia normocítica e normocrômica (n= 33), excetuando 11pacientes com ADC, dos 22 restantes, 14 mostraram níveis elevados de FS. Ou seja, dos 44 indivíduos com anemia analisados, 34 (77,2%) apresentaram valores de FS sugestivos de acúmulo de Fe. A **Tabela 9** mostra a classificação CDC desses pacientes.

Por outro lado, no grupo de pacientes HIV positivo sem anemia (n= 42), somente em 7 pacientes (16,6%) foram observadas concentrações aumentadas de FS.

Tabela 9: Pacientes anêmicos, excetuando os com diagnóstico de ADC, Anemia ferropriva e Anemia megaloblástica, que mostraram níveis elevados de FS e suas respectivas classificação do CDC.

GRUPOS	PARÂMETROS LABORATORIAIS	SUBCATEGORIA CDC	Total com FS ↑
Anemia Microcítica-Hipocrômica (n=5)	Fe N e FS ↑	3 C3	4
	Fe ↑ e FS ↑	1 C2	
Anemia Macroscítica- Hipercrômica (n= 18)	Fe N e FS ↑	10 C3	16
	Fe ↑ e FS ↑	1 A2; 4 C3; 1 B3	
Anemia Normocítica- Normocrômica (n= 21)	Fe N e FS ↑	1 A1; 1 B2; 12 C3	14

↑- Aumento; N- normal; Fe, ferro sérico; FS, ferritina sérica.

4. Avaliação do grupo com ADC, comparando-o com os indivíduos sem anemia

Após a classificação dos pacientes de acordo com os tipos de anemia, separamos 2 grupos de interesse: 19 pacientes com diagnóstico de ADC (anemia, Fe sérico diminuído, dosagem de FS normal ou elevada, concentração de Tf normal ou reduzida) e 42 pacientes HIV positivo sem anemia.

Houve uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,0073$) entre a idade dos pacientes com ADC (mediana=30 anos, mínimo=23 e máximo=47 anos) e sem anemia (mediana=36 anos, mínimo=18 e máximo=59 anos).

Na **Tabela 10** estão relacionados os valores de mediana, valores mínimo e máximo das variáveis referentes ao metabolismo do Fe nos 2 grupos. Como pode ser observado, não houve diferença significativa entre os grupos com ADC e sem anemia quanto às concentrações de sTfR, mesmo quando relacionado com a FS, conforme proposto por Beguin (1992).

Tabela 10: Parâmetros relacionados ao estado do ferro nos grupos estudados. Os resultados estão apresentados na forma de mediana (mínimo-máximo).

Variáveis	ADC (n= 19)	Sem anemia (n=42)	Valor de P
Fe sérico (µg/dl)	40,0 (2,0-50,0)	146,5 (22,0-380,0)	P < 0,0001
Tf (g/l)	1,2 (0,5-2,9)	2,3 (0,7-4,9)	P = 0,0002
FS (ng/l)	1000,0 (49,7-7580,0)	102,0 (11,3-1280,0)	P < 0,0001
sTfR (mg/l)	1,7 (0,6-6,6)	1,5 (0,3-3,2)	P = 0,4976
sTfR/log FS	0,5 (0,2-2,1)	0,7 (0,1-2,1)	P = 0,2617

Fe sérico, ferro sérico; Tf, transferrina; FS, ferritina sérica; sTfR, receptor solúvel de transferrina; sTfR/log Ferritina, índice sTfR/log ferritina.

Na **Tabela 11** constam os valores de mediana, valores mínimo e máximo nos grupos com ADC e sem anemia, referentes aos parâmetros relacionados aos RTC, PLT, EPO e INF γ . O valor de MFI% foi significativamente superior no grupo com ADC (P= 0,0259), embora o número total de RTC tenha sido semelhante nos 2 grupos. Como pode ser observado, não houve diferença entre as concentrações de IFN- γ entre os dois grupos, embora todos os pacientes tivessem apresentado valores acima dos normais.

Tabela 11: Valores de mediana (mínimo-máximo) das variáveis referentes à eritropoiese, relação CD4/CD8 e níveis de IFN- γ nos grupos com e sem anemia.

Variáveis	ADC (n=19)	Sem anemia (n=42)	Valor de P
Hb (g/dl)	9,43 (6,1-13,6)	14,5 (12,3-17,9)	P < 0,0001
IFN γ (pg/ml)	98,8 (18,0-246,5)	111,7 (18,9-211,2)	P = 0,8609
EPO (mU/ml)	23,1 (3,20-133,5)	13,35 (2,90-122,0)	P = 0,1070
CD4/CD8	0,13 (0,01-3,30)	0,47 (0,06-1,56)	P = 0,0057
PLT ($\times 10^9$ /l)	157,0 (10,8-559,0)	175,0 (31,0-416,0)	P = 0,9565
MFI%	14,0 (2,86-25,2)	10,10 (4,29-24,0)	P = 0,0259
RTC ($\times 10^9$ /l)	34,0 (15,60-142,30)	39,86 (12,80-109,20)	P = 0,3874

Hb, hemoglobina; IFN- γ , interferon- γ ; EPO, eritropoietina; CD4/CD8, razão de linfócitos T CD4/ linfócitos T CD8; PLT, plaquetas; MFI, índice de fluorescência médio; RTC, reticulócitos.

Foram testadas várias correlações entre os diferentes parâmetros (**Tabela 12**). De acordo com os valores dos coeficientes de correlação encontrados, pudemos observar que houve uma correlação moderada ($r= 0,5075$; $P= 0,0006$) entre os valores da relação CD4/CD8 e as contagens de PLT somente no grupo sem anemia. Os valores de IFN- γ estiveram inversamente correlacionados com os níveis da relação CD4/CD8 tanto no grupo com ADC ($r= -0,8054$; $P < 0,0001$), quanto no grupo sem anemia ($r= -0,6470$; $P= 0,0027$).

O grau de anemia, medido pelos níveis de Hb, esteve inversamente relacionado com as concentrações de EPO no grupo com ADC ($r= -0,6353$, $P= 0,0035$). Não houve correlação entre os valores de sTfR e valores de Fe sérico em ambos os grupos.

Tabela 12: Coeficiente de correlação de Spearman (r) entre as variáveis nos grupos ADC e sem anemia.

Correlações	ADC	Sem anemia
CD4/CD8 x PLT	$r= 0,1247$ $P= 0,6108$	$r= 0,5075$ $P= 0,0006$
IFN- γ x sTfR	$r= -0,0790$ $P= 0,7476$	$r= -0,0211$ $P= 0,9317$
IFN- γ x CD4/CD8	$r= -0,8054$ $P < 0,0001$	$r= -0,6470$ $P= 0,0027$
IFN- γ x RTC	$r= -0,3122$ $P= 0,1930$	$r= -0,4609$ $P= 0,0470$
IFN- γ x Hb	$r= 0,1930$ $P= 0,4284$	$r= 0,0703$ $P= 0,7749$
IFN- γ x FS	$r= 0,1280$ $P= 0,6013$	$r= 0,0456$ $P= 0,8528$
IFN- γ x Fe	$r= -0,1721$ $P= 0,4810$	$r= -0,5578$ $P= 0,0131$
EPO x Hb	$r= -0,6353$ $P= 0,0035$	$r= -0,1474$ $P= 0,3513$
sTfR x Fe	$r= -0,4430$ $P= 0,0575$	$r= 0,0898$ $P= 0,5715$



DISCUSSÃO

Pacientes com a aids desenvolvem, além da depressão da imunidade, com subsequente acometimento de infecções oportunistas e neoplasias, diversas manifestações clínicas relacionadas às alterações hematológicas, como displasia da MO, trombocitopenia, leucopenia e anemia (**Aboulafia & Mitsuyasu, 1991**). Através do nosso estudo, pudemos confirmar a alta frequência dessas manifestações nos pacientes HIV positivo. Por tratar-se de uma amostragem oriunda de pacientes HIV positivo que procuraram atendimento médico especializado, a frequência das alterações observadas nessa investigação, não reflete a incidência das mesmas na população HIV positivo em geral. Não obstante, foi possível dimensionar a dificuldade, em termos laboratoriais, de diagnosticar e de propor possíveis etiologias para as diversas desordens hematológicas, reforçando o caráter multifatorial e a somatória de processos que envolvem a fisiopatologia da aids, de maneira geral, e das manifestações hematológicas, de maneira particular.

Das 111 amostras de sangue obtidas aleatoriamente de pacientes HIV positivo atendidos no Hospital das Clínicas/UNICAMP, observamos que 69 deles (62,2%) apresentaram anemia, enquanto 42 (37,8%) mostraram níveis de Hb normal. Esses 69 pacientes anêmicos foram classificados, inicialmente, de acordo com o tipo morfológico da série vermelha, através dos valores de VCM e HCM. Os nossos resultados foram concordantes com os de literatura, onde a anemia normocítica e normocrômica correspondeu ao tipo morfológico de anemia mais comum em pacientes HIV positivo. Assim, 47,8% dos casos de anemia, ou seja, 33 dos 69 pacientes, tinham anemia normocítica e normocrômica, enquanto 22 pacientes (31,8%) mostraram anemia macrocítica e hipercrômica e a minoria dos pacientes (n=14 ou 20,2%) foram classificados como tendo anemia microcítica e hipocrômica, sendo confirmada a deficiência de Fe em apenas 2 indivíduos. De fato, a incidência de anemia ferropriva é baixa em pacientes HIV positivo. A macrocitose devido à deficiência de vitamina B12 ou ácido fólico foi confirmada em 2 pacientes. A macrocitose e a megaloblastose de medula óssea em pacientes HIV positivo são raras e a real participação das deficiências desses nutrientes como agentes causais das anemias na aids ainda não está de todo determinada (**Kreuzer & Rockstroh, 1997**).

Bain (1999), em uma revisão sobre a patogênese da anemia na infecção pelo HIV relata que no início da infecção, os eritrócitos são normocíticos e normocrômicos, podendo tornar-se hipocrômicos e microcíticos com a progressão da infecção para estágios crônicos ou na vigência de infecções recorrentes. Se o paciente faz uso de drogas, como por exemplo AZT, torna-se mais difícil o desenvolvimento da microcitose, favorecendo assim o desenvolvimento da macrocitose.

As drogas usadas no tratamento da aids contribuem para o desenvolvimento da anemia por causar supressão na medula óssea ou hemólise. A supressão medular ocorre não somente com drogas antiretrovirais, mas também com certas drogas usadas para o tratamento de infecções oportunistas. O AZT administrado isoladamente e em doses elevadas causa supressão na medula associada com macrocitose e eritropoiese megaloblástica. Estas alterações são discretas quando comparadas às alterações decorrentes da administração de terapia tripla do AZT em dose reduzida.

Outros inibidores de nucleosídeos, tais como didanosine e lamivudine, causam alterações mais graves do que o estavudine. Em relação às drogas inibidoras da protease, tais como saquinavir, ritonavir e indinavir, há poucas evidências de toxicidade hematológica. Dentre as drogas usadas para o tratamento de infecções oportunistas, a mais comum é a ganciclovir, usada para infecções pelo citomegalovirus e causa anemia por ter um efeito supressor sobre a medula óssea. A anemia hemolítica induzida por drogas é causada por drogas oxidantes como a dapsona, usada na profilaxia da infecção pelo *Pneumocystis carinii* e pela primaquina, usada em associação com a clindamicina para o tratamento da infecção pelo *Pneumocystis*. Nesses indivíduos, embora possa haver supressão medular, a contagem de RTC está elevada, assim como as concentrações de *lactate dehydrogenase* e bilirrubina, enquanto a haptoglobina é ausente (Bain, 1999).

No protocolo adotado, a contagem de RTC elevada seria o primeiro indicador de um possível processo hemolítico. Somente 2 pacientes mostraram contagens de RTC acima dos valores de referência, porém essa elevação foi super discreta, não sendo sugestiva de hemólise.

Além da anemia, através dos dados fornecidos pelo hemograma, observamos a grande frequência de outras citopenias, tanto nos indivíduos anêmicos como nos que conservavam os valores de Hb dentro dos limites de normalidade. É comum encontrar múltiplas citopenias no mesmo paciente (**Zon et al, 1987**). As citopenias podem ser devidas ao efeito direto da infecção dos precursores celulares pelo HIV, aos efeitos secundários decorrentes de infecções oportunistas, ou outras complicações clínicas originadas de outras doenças associadas (**Coyle, 1997**). São descritas, ainda, alterações no microambiente medular, presença de auto-anticorpos, deficiência nos níveis de *Granulocyte- Colony Stimulating Factor* (G-CSF, por exemplo) e efeito de drogas (**Evans & Scadden, 2000**).

A neutropenia é observada frequentemente em indivíduos HIV positivo e o grau de neutropenia está correlacionado com o nível de imunossupressão. É descrito que 50 a 70% dos pacientes com imunodeficiência grave apresentam neutropenia (**Evans & Scadden, 2000**), o que não foi confirmado no nosso estudo, onde a maioria dos pacientes pertencia à classe C3, mas somente cerca de 35% deles mostrou número reduzido de neutrófilos.

A linfopenia, como esperado, foi freqüente, principalmente no grupo de pacientes anêmicos, o que condiz com as evidências de baixas contagens de células CD4⁺ associadas à deterioração do sistema imune (**Coyle, 1997**).

Quanto às PLT, a maior parte dos nossos pacientes apresentou número normal de PLT e a plaquetopenia esteve presente em porcentagens semelhantes nos grupos com e sem anemia. É descrito que a plaquetopenia é a primeira alteração laboratorial manifestada em 10% dos pacientes, independente do estadio da doença. Mais uma vez, as causas são múltiplas: destruição mediada por auto-anticorpos, trombopoiese deficiente, efeito tóxico de medicação, infecção de megacariócitos pelo HIV, ação de citocinas e resposta deficiente aos fatores de crescimento celular (**Aboulafia & Mitsuyasu, 1991; Coyle, 1997; Evans & Scadden, 2000**). San Miguel e colaboradores (**1997**) demonstraram, ainda, que infecções micobacterianas atípicas causam síndromes hemofagocíticas em pacientes com aids, resultando em neutropenia e trombocitopenia, que podem estar associadas à anemia.

ADC em pacientes HIV positivo

Um dos objetivos do nosso estudo foi selecionar um grupo de pacientes com ADC com a finalidade de analisarmos aspectos relacionados com o metabolismo do Fe e a associação dos níveis de IFN- γ , comparando-o com um grupo de pacientes HIV positivo sem anemia.

O grupo ADC foi selecionado dentre os 69 pacientes com anemia, pelos critérios laboratoriais de diminuição do nível de Fe sérico, níveis normais ou elevados de FS e concentrações de Tf normal ou diminuído (Weiss, 1999). Pacientes sem anemia mostraram ter maior sobrevivência do que pacientes com ADC. Essa observação é concordante com dados da literatura que correlacionam a presença de anemia com estágios mais avançados da doença, presença de infecções secundárias e redução das contagens de linfócitos CD4⁺. Essas associações, evidentemente, contribuiriam para a morte mais precoce dos pacientes (Coyle, 1997; Evans & Scadden, 2000).

Como mencionado anteriormente, a ADC é uma anemia hipoproliferativa, na qual concentrações diminuídas de Fe no soro ou plasma são observadas, embora os estoques de Fe no sistema reticuloendotelial estejam adequados ou mesmo aumentados (Means, 1999). Gupta e colaboradores (1986) observaram em pacientes com aids, concentrações elevadas de FS e que níveis de ferritina tornavam-se mais elevados à medida que a gravidade da doença aumentava, e desta forma os autores sugeriram que o excesso de ferritina colaboraria na patogênese da imunodeficiência mediada por células na aids. Atualmente já se sabe que o aumento do estoque de Fe tem um efeito deletério na evolução dos pacientes com HIV. A ferritina tem um efeito inibitório na proliferação celular e desempenha um importante papel no “stress” oxidativo, liberando radicais livres capazes de aumentar a replicação do HIV (Savarino et al, 1999).

A inter-relação entre os distúrbios do metabolismo do Fe e o sistema imune, atualmente, estão melhor definidas, embora não totalmente elucidadas.

Dentre os vários processos envolvidos na fisiopatologia da ADC, estudamos mais especificamente a participação do IFN- γ . O IFN- γ pertence a um grupo de citocinas que participa da fase efetora da resposta imune mediada por células. Age diretamente sobre linfócitos T e B promovendo sua diferenciação, assim como ativa os neutrófilos e estimula

a atividade citolítica de células NK. É um potente ativador dos fagócitos mononucleares, induzindo a síntese de enzimas que destroem micróbios fagocitados, e tem atividade tumoricida. Além disso ele induz a síntese de outras citocinas pró-inflamatórias, como IFN- α , IL-1 e IL-6. Entretanto, quando produzidas em excesso, podem tornar-se patogênicas (**Fresno et al, 1996; Abbas et al, 2000**).

A participação do IFN- γ no metabolismo do Fe tem sido descrita sob diversos aspectos. O IFN- γ parece deprimir a expressão do TfR através de mecanismos transcricionais e pós-transcricionais. Além disso, a IL-1 liberada pelo macrófago estimulado pelo IFN- γ age sobre os neutrófilos, induzindo à liberação de lactoferrina, que tem maior afinidade ao Fe do que a Tf. O Fe é transportado aos macrófagos, acumulando na forma de ferritina e hemossiderina (**Abshire, 1996**). Assim, citocinas pró-inflamatórias parecem causar hipoferremia pela indução da síntese de ferritina, aumentando os estoques de ferritina nos macrófagos e hepatócitos, enquanto o IFN- γ tenta manter o Fe fora dos macrófagos, pela menor captação do Fe pelos sTfR. Macrófagos repletos de Fe exibem uma reduzida resposta ao IFN- γ , produzem menos TNF α e radicais livres de oxigênio, o que prejudica a defesa imunológica contra vários patógenos intracelulares e vírus (**Weiss, 1999**).

Outras ações do IFN- γ relacionadas à hematopoiese, seriam o efeito inibitório sobre a proliferação de células progenitoras eritróides, com a participação do TNF- α , conforme demonstrado “in vitro” (**Fuchs et al, 1991**) e a promoção da apoptose dos progenitores eritróides (**Means, 1999**).

Não observamos correlação estatística entre os valores de IFN- γ e os níveis de sTfR. As concentrações de IFN- γ mostraram estar elevadas nos grupos com e sem anemia, assim como as concentrações de sTfR estavam em níveis normais ou levemente aumentados. No grupo de pacientes com ADC não houve uma correlação ($r = -0,4430$; $p = 0,0575$) entre os níveis de Fe circulantes e os de sTfR. Essa correlação quando positiva representa um dos parâmetros diferenciais entre ADC e anemia ferropriva. Embora ambas anemias cursem com hipoferremia, na anemia ferropriva há um grande estímulo para a síntese dos TfR, proporcional à carência do Fe, o que não acontece na ADC (**Cook, 1999**).

Em um estudo onde foi avaliada a eficiência do sTfR no diagnóstico da depleção de ferro, foi demonstrado que os níveis de sTfR estão elevados tanto na anemia ferropriva como na depleção de Fe associada a um processo infeccioso ou inflamatório, diferentemente dos indivíduos com ADC (**Punnonen et al, 1997**). No nosso grupo de estudo, somente 2 pacientes mostraram resultados laboratoriais sugestivos de anemia ferropriva. Entretanto, não foram observadas concentrações elevadas de sTfR nesses indivíduos. Tratando-se de pacientes com anemia ferropriva cuja doença de base é bastante complexa, onde diversos processos patogênicos estão envolvidos, acrescidos da ação de diversas drogas utilizadas no tratamento, a análise do comportamento do sTfR nesses indivíduos fica prejudicada. Haveria necessidade de se estudar um grupo maior de indivíduos HIV positivo com anemia ferropriva comprovada pela avaliação dos estoques de ferro na medula óssea, para conhecer com mais profundidade a resposta do sTfR à ferropenia nos pacientes infectados pelo HIV.

Curiosamente, uma moderada correlação inversa foi observada entre os valores de IFN- γ e Fe somente no grupo de pacientes não anêmicos. Uma explicação para a redução das concentrações de Fe em pacientes não anêmicos é que a redução no nível de Fe pode ser conseqüente a um maior consumo de Fe para a produção de novas partículas virais nas células infectadas, conforme sugerido por **Weinberg & Weinberg (1995)**.

Aparentemente, a hipoferremia pode ter um efeito benéfico em pacientes em processos infecciosos. A menor oferta de Fe, através do desvio do Fe circulante para os locais de estoque, além de limitar a proliferação tecidual, limitaria também o crescimento de patógenos invasores e células tumorais, já que afetaria o metabolismo energético das células ou a síntese de DNA (**Winberg, 1984; Winberg & Weinberg, 1995**). Além disso, o menor aporte de oxigênio aos tecidos poderia afetar, primariamente, células de proliferação rápida, como as células malignas e microrganismos (**Weiss, 1999**).

O caráter hipoproliferativo da ADC em pacientes HIV positivo foi por nós confirmado, através dos resultados relativos à EPO e aos RTC. Dos 19 pacientes com ADC, somente 8 mostraram valores de EPO acima do normal, o que conferiu uma correlação moderada entre EPO e Hb. A diminuição dos níveis de EPO poderia ser explicada por uma suposta refratariedade de macrófagos repletos de ferro ao estímulo do IFN- γ . A redução da

eritropoiese na ADC parece ter como causa primária a falência dos progenitores eritróides da medula óssea em responder ao aumento dos níveis de EPO (**Fuchs et al, 1994**). Embora níveis superiores de EPO sejam observados nos indivíduos com ADC do que nos indivíduos sem anemia, esses valores são inferiores aos detectados em indivíduos igualmente anêmicos mas sem doença crônica, conforme relatado em um estudo com pacientes com artrite reumatóide (**Birgeard et al, 1987**).

A ação direta do vírus HIV sobre células produtoras de EPO foi evidenciada em células Hep 3B de hepatoma, uma linhagem de células em que a hipóxia é um estímulo para a produção de EPO. Foi observada uma depressão da produção de EPO após a infecção da célula pelo HIV, potencialmente devido à supressão da transcrição do RNAm da EPO (**Wang et al, 1993**). Resta analisar se o mesmo acontece nas células renais.

Curiosamente, no nosso estudo, 7 dos 42 indivíduos sem anemia também apresentaram EPO elevada. Nesse grupo não houve correlação entre EPO e Hb. A razão para valores elevados de EPO em pacientes com concentrações de Hb normais é difícil de ser explicada. Uma possibilidade seria a ação de drogas. Praticamente todos (39 dos 42) pacientes sem anemia faziam uso de drogas anti-retrovirais, incluindo o AZT, e muitos deles, apesar de apresentarem níveis normais de Hb, tinham número de eritrócitos no limite ou pouco abaixo da normalidade, resultando em macrocitose. Isso sugere que a eritropoiese, de algum modo, pode estar comprometida, o que nos leva a analisar com cautela os dados referentes à EPO.

As contagens absolutas de RTC foram similares em ambos os grupos e 28% dos pacientes mostraram reticulocitopenia, independente da presença de anemia. Por outro lado, a fração MFI, correspondente aos RTC imaturos, foi maior em pacientes anêmicos do que em não anêmicos. A liberação aumentada ou acelerada de RTC imaturos pela medula óssea, representa a atividade medular em responder ao estímulo periférico, como acontece com a EPO, frente à hipóxia (**Kendall et al, 1994; Davis et al, 1995**). Davis e colaboradores (**1995**) sugerem que somente em pacientes que apresentam baixas contagens de RTC absolutos e imaturos pode se afirmar que tenham uma verdadeira hipoproliferação medular. Chang & Kass (**1997**) analisaram 3 pacientes HIV positivo e observaram que as contagens de RTC encontravam-se em níveis normais ou subnormais, enquanto a fração de

alta imaturidade apresentava-se normal ou aumentada. Foi sugerido que o aumento da fração mais imatura dos RTC poderia resultar de uma anormalidade qualitativa da eritropoiese (**Tatsumi & Izumi, 1991**), mas a questão não está de todo elucidada

Aparentemente, nos pacientes HIV positivo que estudamos, houve uma tentativa de resposta medular, através da liberação de RTC imaturos na circulação, embora a quantidade de RTC na circulação ainda seja insuficiente para compensar o aumento da demanda.

Relação entre ADC e estágio da doença.

Pacientes com ADC apresentaram valores da relação CD4/CD8 menores do que os pacientes não anêmicos, mostrando uma associação entre o avanço da doença e o acometimento por desordens hematológicas. Estes dados são concordantes com a literatura (**Kreuzer & Rockstroh, 1997; Spada et al 1998**). O aumento da depleção de células CD4 e o conseqüente desequilíbrio da relação CD4/CD8, causa a progressão da infecção pelo HIV que, por sua vez, aumenta a mielossupressão mediada por citocinas e, conseqüentemente, o aparecimento e agravamento da anemia (**Sullivan et al, 1998**). Nossos resultados reforçam esses dados, já que houve uma significativa correlação inversa entre níveis de IFN- γ e a relação CD4/CD8 em ambos os grupos e uma fraca correlação inversa entre níveis de IFN- γ e contagens de RTC.

Dentre as citopenias descritas em pacientes com aids, a trombocitopenia parece ser causada por um mecanismo diferente da anemia e leucopenia. Enquanto as duas últimas seriam um reflexo de uma insuficiência medular e hematopoiese ineficaz, na trombocitopenia um mecanismo periférico de caráter imune parece ter importante participação (**Román et al, 1992**). Nossos resultados reforçam esse conceito. A correlação entre a contagem de PLT e a relação CD4/CD8 no grupo de pacientes não anêmicos sugere que a preservação do número de células CD4⁺ contribui para a conservação do número de PLT circulantes, provavelmente porque a piora da imunodeficiência favorecia a infecção de precursores megacariocíticos pelo HIV ou aparecimento de infecções oportunistas e/ou neoplasias causadoras de trombocitopenia (**Evans & Scadden, 2000**).

Através da análise desse grupo de pacientes infectados pelo HIV, pudemos observar que além das alterações hematológicas já comentadas, foi bastante freqüente a elevação dos níveis de ferritina, independente da concomitância da ADC e mesmo em alguns pacientes não anêmicos. Esse fato é bastante importante, uma vez que já está descrito que o acúmulo de ferro está relacionado com estágios mais avançados da doença **(Kreuzer & Rockstroh, 1997)**. O excesso de ferro favorece a replicação do HIV, assim como a ferritina tem um efeito inibitório sobre a proliferação celular contribuindo para a perda progressiva de linfócitos T CD4⁺ nos indivíduos HIV positivo **(Savarino et al, 1999)**.

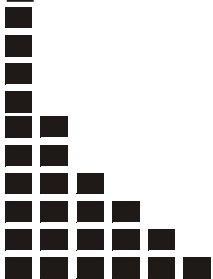
Interessante, também, é a contribuição da haptoglobina no acúmulo de Fe em pacientes HIV positivo. A haptoglobina tem como função fisiológica principal formar complexos com a hemoglobina liberada após a lise da hemácia, cujo complexo é rapidamente captado pelo hepatócito. Maiores níveis de ferritina e maior saturação da Tf foram observados em pacientes que possuíam a haptoglobina do tipo Hp 2-2, portanto, menos eficiente na remoção de hemoglobina livre. A carga viral nesses pacientes foi maior e a sobrevida menor, quando comparados com indivíduos dos subgrupos 2-1 e 1-1 **(Delanghe et al, 1998)**.

Através desse estudo pudemos observar várias alterações no metabolismo do ferro, em pacientes com e sem anemia. Pudemos, ainda, constatar a dificuldade de se estabelecer o diagnóstico laboratorial da causa da anemia em pacientes HIV positivo, confirmando o seu caráter multifatorial. Sabendo da importância de se conhecer a causa da anemia, novos estudos devem ser realizados no sentido de se estabelecer o diagnóstico, de maneira rápida e precisa.



CONCLUSÃO

1. Alterações hematológicas foram frequentes nos pacientes HIV positivo estudados, representadas principalmente por citopenias.
2. O tipo morfológico de anemia predominante foi a anemia normocítica-normocrômica.
3. Dentre os 44 pacientes cujos exames laboratoriais permitiram a sugestão de diagnóstico para a anemia, 43,2% deles corresponderam à ADC, indicando a grande frequência desse tipo de anemia em pacientes HIV positivo.
4. Não houve diferença entre os níveis de sTfR entre pacientes com ADC e pacientes sem anemia.
5. Embora o número de RTC nos pacientes com ADC tenha sido normal ou reduzido, o que poderia sugerir hipoproliferação medular, o maior número de RTC imaturos liberados e a correlação moderada entre EPO e Hb, sugerem uma tentativa da medula óssea em compensar a anemia.
6. Concentrações elevadas de IFN- γ nos grupos com e sem anemia, indicam a grande produção desse mediador pelas células envolvidas na resposta imune.
7. Concentrações elevadas de FS foram observadas em pacientes com e sem anemia. O acúmulo de Fe pode contribuir para o agravamento da doença e piora da resposta imune desses indivíduos.
8. Não foi possível estabelecer uma correlação entre o IFN- γ e o sTfR, mas ficou evidente a correlação entre a elevação dos níveis de IFN- γ e a deterioração do sistema imune, expresso pela correlação inversa entre IFN- γ e relação CD4/CD8.
9. Através desse estudo pudemos observar várias alterações no metabolismo do ferro, em pacientes com e sem anemia. Pudemos, ainda, constatar a dificuldade de se estabelecer o diagnóstico laboratorial da causa da anemia em pacientes HIV positivo, confirmando o seu caráter multifatorial. Sabendo da importância de se conhecer a causa da anemia, novos estudos devem ser realizados no sentido de se estabelecer o diagnóstico, de maneira rápida e precisa.



***REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

- ABBAS AK, LICHTMAN AH & POBER JS.** : Imunologia celular & molecular; 3ª. Ed, Rio de Janeiro: Revinter LTDA, 2000, 460-471.
- ABOULAFIA DM & MITSUYASU RT.** Hematological abnormalities in AIDS. *Hematol Oncol Clin North Am*, 1991, 5:195-214.
- ABSHIRE TC.** The anemia of inflammation. *Pediat Clin North Am*, 1996, 43: 623-637.
- BAIER – BATTERLICH G, WACHTER H & FUCHS D.** Role of Neopterin and 7,8 – dihydroneopterin in human Immunodeficiency Virus Infection: Marker for disease Progression and Pathogenic Link. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, 1996, 13:184 – 193.
- BAIN BJ.** Pathogenesis and pathophysiology of anemia in HIV infection. *Curr Opin Hematol*, 1999, 6(2): 89-98.
- BEGUIN Y.** The Soluble Transferrin Receptor: biological aspects and clinical usefulness as quantitative measure of erythropoiesis. *Haematologica*, 1992, 77: 1-10.
- BIRGEARD G, HALLGREN R & CARO V.** Serum erythropoietin in rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritis: Relationship to anaemia and the effect of anti-inflammatory treatment. *Br J Haematol*, 1987, 65: 479-483.
- BOUNDURANT MC & KOURY MJ.** Anemia induces accumulation of erythropoietin in RNA in the kidney and liver. *Mol Cell Biol*, 1986, 6: 2731-2733.
- BOWEN DT, CULLIGAN D, BEGUIN Y, KENDALL R & WILLIS N.** Estimation of effective and total erythropoiesis in myelodysplasia using serum transferrin receptor and erythropoietin concentrations, with automated reticulocyte parameters. *Leukemia*, 1994, 8: 151-155.
- BRASIL.** Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. *Guia de Vigilância Epidemiológica*. Brasília, Fundação Nacional de Brasília, 1998, 4ª edição.

- CARTWRIGTH GE.** The anemia of chronic disorders. *Semin Hematol*, 1996, 3: 351.
- CHANG C-C & KASS L.** Clinical Significance of immature reticulocyte fraction determined by automated reticulocyte counting. *Am J Clin Pathol*, 1997, 108: 69-73.
- COOK JD.** The measurement of serum transferrin receptor. *Am J Med Sci*, 1999, 318: 269-276.
- CORBERAND JX.** Reticulocyte analysis using flow cytometry. *Hematol Cell Ther*, 1996,38: 487-494.
- COYLE TE.** Hematologic Complications of Human Immunodeficiency Virus Infection and the Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Med Clin North Am*, 1997, 81(2): 449-470.
- CURRAN JW.** HIV e a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida: Epidemiologia da Infecção por HIV e AIDS/SIDA. In: BENNETT & PLUM, eds; 20ª ed. Cecil Tratado de Medicina Interna. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997, 2037 – 2042.
- DACIE JV & LEWIS SM.** Practical Haematology; 8ª. Ed. Edinburgh-Churchill: Livingstone, 1996.
- DALAL BI, STOCKFORD GR, NAIMAN SC, SPINELLI JJ & PHILLIPS GL.** Criteria for marrow engraftment: comparison of reticulocyte maturity index with conventional parameters. *Bone Marrow Transplant*, 1996, 17: 91-92.
- DAVIES SV, CAVILL I, BENTLEY N, FEGAN CD, POYTON CH & WHITTAAKER JÁ.** Evaluation of erythropoiesis after bone marrow transplantation: quantitative reticulocyte counting. *Br J Haematol*, 1992, 81:12-17.
- DAVIS BH, ORNVOLD K & BIGELOW NC.** Flow cytometric reticulocyte maturity index: a useful laboratory parameter of erythropoietic activity in anemia. *Cytometry*, 1995, 22:35-39.

DELANGHE JR, LANGLOIS MR, BOELAERT JR, VAN-ACKER J, VAN-WANZEELE F, van der GROEN G, HEMMER R, VERHOFSTEDE C, de BUYZERE M, de BACQUER D, ARENDT V & PLUM J. Haptoglobin polymorphism, iron metabolism and mortality in HIV infection. *AIDS*, 1998, 12: 1027-1032.

DENZ H, HUBER P, LANDMANN R, ORTH B, WACHTER H & FUCHS D. Association between the activation of macrophages, changes of iron metabolism and the degree of anaemia in patients with malignant disorders. *Eur J Haematol*, 1992, 48: 244-248.

EASTGATE JÁ, WOOD NC, DIGIOVINE FS, SYMONS JÁ, GRINLINTON FA & DUFF GW. Correlation of plasma interleukin – 1 levels with disease activity in rheumatoid arthritis. *Lancet*, 1988, 2 (8613); 706 – 709.

AIDS – os primeiros 20 anos. - www.e-infecto.com.br

ESCHBACH JW, EGRIE JC, DOWNING MR, BROWNE JK & ADAMSON JW. Correction of the anaemia of end-stage renal disease with recombinant human Erythropoietin. *N Engl J Med*, 1987, 316: 73 – 70.

EVANS RH & SCADDEN DT. Haematological aspects of HIV infection. *Baillière's Clin Haematol*, 2000; 13: 215-230.

FAQUIN WC, SCHNEIDER TJ & GOLDBERG MA . Effect of Inflammatory Cytokines On hypoxia – induced Erythropoietin Production. *Blood*, 1992, 79: 1987-1994.

FERGUSON BJ, SKIKNE BS, SIMPSON KM, BAYNES RD & COOK JD. Serum transferrin receptor distinguishes the anemia of chronic disease from iron deficiency anemia. *J Lab Clin Med*, 1992, 19: 385-390.

FRESNO M, KOPF M & RIVAS L. Cytokines and infectious diseases. *Immunol Today*, 1996, 18: 56-58.

- FUCHS D, HAUSEN A, REIBNEGGER G, WERNER ER, DIERICH MP & WACCCHTER H.** Neopterin as a maker of activated cell – mediated immunity: appliccation in HIV infection. *Immunol Today*, 1988, 9: 150 – 155.
- FUCHS D, HAUSEN A, REIBNEGGER G, WERNER ER, FELMAYER G, DIERICH MP & WACHTER H.** Immune activation and the anaemia associated with chronic inflammatory disorders. *Eur J Hematol*, 1991, 46: 65-70.
- FUCHS D, SHEARER GM & BOSEELL RN.** Negative correlation between blood cell counts and serum neopterin concentrations in patients with HIV infection. *AIDS*, 1991, 5: 209-212.
- FUCHS D, ZAN GERLE R, DENZ H WACHTER H.** Inhibitory cytokines in patients with anemia of chronic disorders. *Ann NY Acad Sci*, 1994, 718: 344-346.
- FURMANSKI P & JOHNSON CS.** Macrophage control of normal and leukemic erythropoiesis. Identification of the macrophage derived erythroid suppressing activity as interleukin-1 and the mediator of its effect as tumor necrosis factor. *Blood*, 1990, 75: 2328.
- GALLO RC.** HIV – The cause of AIDS: on overview on its biology, mechanisms of disease induction, and our attempts to control it. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 1988, 1: 521 – 535.
- GROOPMAN JE, MOLINA J-M & SCADEN DT.** Hematopoietic growth factor biology and clinical applications. *N Engl J Med*, 1989, 321: 1449-1459.
- GROTTO HZW, COSTA FF, CARNEIRO MV, GALIZA NETO GC.** Serum neopterin in patients with chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1994, 88: 75.
- GROTTO HZW, VIGORITTO AC, NORONHA JFA, LIMA GAF.** Immature reticulocyte fraction as a criterion for marrow engraftment. Evaluation of a semi-automated reticulocyte counting method. *Clin Lab Haem*, 1999, 21: 285-287.

- GUPTA S, IMAM A & LICORISH K.** Serum ferritin in acquired immune deficiency syndrome. *J Clin Lab Immunol*, 1986, 20: 11-13.
- HOFFBRAND AV & PETTIT JE.** Essential haematology; 3^a. Ed. Oxford: *Blackwell Science*, 1993: 179.
- KATZ MH & HOLLANDER H.** HIV Infection. *In*: Tierney Jr LM, Phee SJM & Papadakis MA, eds; 37th Ed. CURRENT – Medical Diagnosis & Treatment. Stanford, Connecticut: Appleton & Lauge, 1998: 1220.
- KAUSHANSKY K, LIN N & ADAMSON JW.** Interleukin – 1 stimulates fibroblasts to synthesize granulocyte – macrophage and granulocyte colony – stimulating factors. Mechanism for the hematopoietic response to inflammation. *J Clin Invest*, 1988, 1: 92–97.
- KEMP JD.** The role of iron and iron binding proteins in lymphocyte physiology and pathology. *J Clin Immunol*, 1993, 13: 81 – 92.
- KENDALL RG, JEFFRIES R, CAVILL I& NORFOLK DR.** Relationship between endogenous erythropoietin levels, reticulocyte RNA distribution: a study of anemic patients with and without renal failure. *Ann N Y Acad Sci*, 1994, 718: 353-355.
- KREUZER KA & ROCKSTROH JK.** Pathogenesis and pathophysiology of anemia in HIV infection. *Ann Hematol*, 1997, 75: 179-187.
- KUSE R.** The appearance of reticulocytes with midium or high RNA content is a sensitive indicator of beginning granulocyte recovery after aplasiogenic cytostatic drug therapy in patients with AML. *Ann Hematol*, 1993, 66: 213-214.
- LÄHDEVIRTA J, MAURY CPJ, TEPPON AM & REPO H.** Elevated levels of circulating cachectin/tumor necrosis Factor in patients with acquired Immunodeficiency Syndrome. *Am J Med*, 1988, 85: 289-291.
- LEWIS DS, CASTELO FILHO A, ACCETTURI CA & GRANATO CFH.** *Atualização Terapêutica; secção I- Doenças Infecciosas e Parasitárias*, 13^a. Ed. São Paulo: Artes Médicas, 1997.

- LOMAR AV & DIAMENT D.** Drogas disponíveis no tratamento específico contra a infecção pelo HIV. *In:* Veronesi R, Focaccia R & Lomar AV, eds. Retrovíruses Humanas HIV/AIDS - Etiologia, Patogenia, Patologia Clínica, Tratamento e Prevenção. São Paulo: Atheneu, 1999.
- MacDOUGALL IC, CAVILL I, HULME B et al.** Detection of functional iron deficiency during erythropoietin treatment: a new approach. *B M J*, 1992, 304: 225-226.
- MAURY CPJ, ANDERSSON LC, TEPPA A M, PATARNEN S & JUVONEN E.** Mechanism of anaemia in rheumatoid arthritis: demonstration of raised interleukin – 1 - beta concentrations in anaemia patients and interleukin - 1 mediated suppression of normal erythropoiesis and proliferation of human erythroleukaemia (HEL) cells in vitro. *Ann Dis*, 1988, 47 (12): 972-978.
- MEANS RT & KRANTZ SB.** Progress in understanding the pathogenesis of the anemia of chronic disease. *Blood*, 1992, 80: 1639-1647.
- MEANS RT.** Advances in the anemia of chronic disease. *Int J Hematol*, 1999, 70: 7-12.
- MELMED RN, TAYLOR JMG, DETELS R, BOZORGMEBIN M & FAHEY JL.** Serum neopterin changes in HIV–infected–subjects: Indicator of significant pathology, CD4 T cell changes, and the Development of AIDS “ . *J Acquir Immune Defic Syndr*, 1989, 1: 70 – 76.
- MOORE RD.** Anaemia and human immunodeficiency virus disease in the era of highly active antiretroviral therapy. *Semin Hematol*, 2000, 37: 18 – 23.
- MURRAY HW.** Interferon-gamma, the activated macrophage, and host defense against microbial challenge. *Ann Intern Med*, 1988, 108: 595-608.
- NECKERS LM.; COSSMAN J.** Transferrin receptor induction in mitogen – stimulated human T – lymphocytes is required for DNA synthesis and is regulated by interleukin-1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983, 89: 3494 – 3498.

- NEEDLEMAN BW, WIGLEY FM & STAIR RW.** Interleukin-1, interleukin-2 , interleukin-4, interleukin-6, tumor necrosis factor -alpha, and interferon-gama levels in serum from patients with scleroderma. *Arthritis Rheum*, 1992, 35 (1): 67 – 72.
- PELOSI – TESTA E, SAMOGGIA P, GIANNELLA G, MONTESORO E, CARAVITA T & SALVO G.** Mechanisms Underlying T – lymphocyte activation; mitogen initiates and IL – 2 amplifies the expression of transferrin receptors via intracellular iron level. *Immunology*, 1988, 64: 273 - 279.
- PERKOCHA LA & RODGERS GM.** Hematologic Aspects of Human Immunodeficiency Virus Infection: Laboratory and Clinical Considerations. *Am J Hematol*, 1988, 29; 94–105.
- POTTS BJ, HOGGAN MD, LAMPERTH L & SPIVAK J.** Replication of HIV – 1 and HIV – 2 in human bone marrow cultures. *Virology* , 1992, 188: 840 - 849.
- PUNNONEN K, IRSALA K, RASAMÄKI A .** Serum transferrin in the diagnosis of iron deficiency. *Blood*, 1997, 89: 1052-1057.
- RHAME SF.** Acquired Immunodeficiency Syndrome. *In*: Hoeprich, P. D. & Jordan, M. C., eds; 4TH. Ed. Infections Diseases. Philadelphia, 1989: 600-616.
- ROITT I, BROSTOFF J & MALE D.** *Imunologia*; 5^a. Ed. Londres, Reino Unido: Manole, 1999, cap10:121-135.
- ROMÁN A, SANCHEZ FJ, OLAVARRÍA E & OUTEIRIÑO J.** Repercusiones Hematológicas de la Infección por el Vírus de la Inmunodeficiência Humana y su Terapeutica. *Sangre*, 1992, 37(2): 119-124.
- SAN MIGUEL LG, CASADO JL, CANIZARES A, LOBO M & GUERRERO A .** High cytomegalovirus antigenemia levels and cytomegalovirus syndrome in patients with AIDS. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, 1997, 16: 307.
- SAVARINO A, PESCARMONA GP & BOELAERT JR.** Iron metabolism and HIV infection: reciprocal interactions with potentially harmful consequences? *Cell Biochem Funct*, 1999, 17: 279-287.

- SEARS DA.** Anemia of chronic disease. *Med Clin North Am*, 1992, 76(3): 567-579.
- SKIKNE BS.** Circulating transferrin receptor assay- Coming of age. *Clin Chem*, 1998, 44: 7-9.
- SPADA C, TREITINGER A & HOSHIKAWA-FUJIMURA AY.** HIV influence on hematopoiesis at the initial stage of infection. *Eur J Haematol*, 1998, 61: 255-260.
- SPIVAK JL, BENDER BS & QUINN TC.** Hematologic abnormalities in the acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Med*, 1984, 77: 224-228.
- STEINBERG HN, CRUMPACKER C & CHATIS PH.** In vitro supression of normal human bone marrow progenitor cells by human immunodeficiency virus. *J Virol*, 1991, 65: 1765 – 1769.
- SULLIVAN PS, HANSON DL, CHU SY, JONES JL, WARD JW & the Adult/Adolescent Spectrum of Disease Group.** Epidemiology of anemia in human immunodeficiency virus (HIV)- infected persons: results from the multistate adult and adolescent spectrum of HIV disease surveillance project. *Blood*, 1998, 91: 301
- TATSUMI N & IZUMI T.** Reticulocyte maturation index as a useful diagnostic parameter. *Sysmex J Int*, 1991, 1: 23-28.
- TESTA U, RUTELLA S, MARTUCCI R et al.** Autologous stem cell transplantation: evaluation of erythropoietic reconstitution by highly fluorescent reticulocytes counts, erythropoietin, soluble transferrin receptors, ferritin, TIBC and iron dosages. *Br J Haematol*, 1997, 96: 762-775.
- TSUDA I & TATSUMI N.** Maturity of reticulocytes in various hematological disorders. *Eur J Haematol*, 1989, 43: 252-254.
- VREUGDENHIL G, LOWENBERG B, VAN-EJIK HG & SWAAK AJB.** Anaemia of chronic disease in rheumatoid arthritis: Raised serum interleukin – 6 (IL – 6) levels and the effects of IL – 6 and on in vitro erithropoiesis. *Rheumatol Int*, 1990, 10:127.

- WACHTER H, FUCHS D, HAUSEN A, REIBNERGGER G, WERNER ER.** Neopterin as marker for activation of cellular immunity: immunologic bases and clinical application. *Adv Clin Chem*, 1989, 27: 81-141.
- WANG Z, GOLDBERG NA, SCADDEN DT.** HIV-1 supresses erythropoietin production in vitro. *Exp Hematol*, 1993, 21: 683-688.
- WEINBERG ED & WEINBERG GA.** The role of iron in infection. *Curr Opin Infect Dis*, 1995, 8: 164-169.
- WEINBERG ED.** Iron with holding: A defense against infection and neoplasia. *Physiol Ver*, 1984, 64: 65-102.
- WEISS G, WACHTER H & FUCHS D.** Linkage of cell-mediated immunity to iron metabolism. *Immunology Today*, 1995, 16: 495-500.
- WEISS G, WIDNER B, ZOLLER H, SCHOBERRSBERGER W & FUCHS D.** Immune response and iron metabolism. *Br J Anaesth*, 1998, 81(1): 6-9.
- WEISS G.** Iron and anemia of chrinic disease. *Kidney Int*, 1999, 55(69): S12-S17.
- WHEATHERALL DJ & CLEGG JB.** The thalassemia syndromes; 4^a. Ed. Oxford-BlackWell Scientific Plub, 1981.
- ZON LI, ARKIN CA & GROOPMAN JE.** Haematological manifestations of the human immune deficiency virus (HIV). *Br J Haematol*, 1987, 99: 1-8.



ANEXOS

**CONSENTIMENTO PÓS INFORMAÇÃO PARA PESQUISAS COM SERES
HUMANOS**

**“ASSOCIAÇÕES HEMATOLÓGICAS E DISTÚRBIOS DO METABOLISMO DO
FERRO
EM PACIENTES INFECTADOS PELO HIV⁺”**

ORIENTADORA: Prof. Dra. Helena Zerlotti Wolf Grotto

ORIENTANDA: Marina Aparecida Salomé

Departamento de Patologia Clínica – FCM – UNICAMP

DADOS DO PACIENTE

NOME: _____

IDADE: _____ RG: _____ HC: _____

ENDEREÇO: _____ Nº: _____

CIDADE: _____ ESTADO: _____ CEP: _____

TELEFONE: _____ () RESIDENCIAL () COMERCIAL () RECADO

RESPONSÁVEL LEGAL PELO PACIENTE: _____

GRAU DE PARENTESCO: _____

IDADE: _____ RG: _____

ENDEREÇO: _____ Nº: _____

CIDADE: _____ ESTADO: _____ CEP: _____

TELEFONE: _____ () RESIDENCIAL () COMERCIAL () RECADO

**OBS.: Prova documental comprobatória da responsabilidade.(Nos casos de
autorização fornecida pelo responsável)**

OBJETIVOS DA PESQUISA

1. Caracterizar os tipos de anemia existentes num grupo de pacientes infectados pelo HIV em diferentes estágios clínicos da doença, através de um protocolo de exames laboratoriais por nós estabelecidos.

2. Selecionar um grupo de pacientes HIV+ com diagnóstico de ADC e analisar aspectos relacionados com o metabolismo de ferro, atividade eritropoiética e ação do IFN- γ , comparando-o os com um grupo de pacientes HIV+ sem anemia.

INFORMAÇÕES AO PACIENTE

- O paciente será submetido à uma punção venosa para coleta de sangue, para realização dos exames laboratoriais, devendo permanecer em jejum de 8 horas.
- Se houver necessidade, o paciente poderá ser convocado para nova coleta de sangue.
- As informações sobre a pesquisa estarão à disposição do paciente ou seu responsável para esclarecimento de qualquer dúvida.
- O paciente poderá deixar de participar da pesquisa a qualquer tempo.
- Fica assegurado ao paciente sigilo quanto a sua identificação, não sendo exposta nas conclusões ou publicações.
- Direito a tratamento médico e indenização a quem tem direito por parte do órgão financiador em casos de danos causados pela pesquisa.
- Se houver gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.
- Informações atualizadas obtidas durante o estudo, ainda que esta possa afetar a vontade do paciente em continuar participando da pesquisa.
- Em caso de recurso ou reclamações, entrar em contato com a secretaria da comissão de ética pelo telefone: (19) 37887232 Campinas.

EXAMES LABORATORIAIS A QUE O PACIENTE SERÁ SUBMETIDO

1. Determinação da relação CD4/CD8;
2. Perfil Hematológico:
 - a) hemograma completo, com contagem de reticulócitos.
3. Avaliação do metabolismo do ferro:
 - a) determinação do ferro sérico;
 - b) determinação da capacidade de ligação do ferro pela transferrina (TIBC);
 - c) dosagem da ferritina sérica;
 - d) dosagem da transferrina;
 - e) determinação do sTfR;

4. Avaliação de um dos participantes no processo imune:

a) IFN- γ ;

5. Avaliação do perfil hepático

a) AST;

b) ALT;

c) GGT;

d) PAL.

6. Determinação da EPO.

Quando necessário para investigação:

7. Deficiência de vitamina B12 e Ácido fólico;

8. Avaliação de anemia hemolítica;

a) Concentração de BI;

b) Determinação de LDH;

c) Dosagem de haptoglobina;

9. Investigação de hemoglobinopatia:

a) Eletroforese de Hb;

b) Dosagem de HbA2.

ASSINATURA DO PACIENTE OU RESPONSÁVEL

Responsável pela Pesquisa
MARINA AP. SALOMÉ
TELEFONE: (19) 32893273
(19) 37887447

Campinas, ____ de _____ de ____ .

Tabela 13: Valores de referência do grupo normal e os valores de referência dos kits.

n	Sexo	Hb	Ht	VCM	HCM	RBC	WBC	PLT	RTC	Fe sérico	TIBC	FS	Tf	sTfR	sTfR/ Log FS	EPO	AST	ALT	GGT	ALP	MFI	IFN- γ
		g/dl	%	fl	pg	$\times 10^9/l$	$\times 10^9/l$	$\times 10^9/l$	$\times 10^9/l$	$\mu g/dl$	$\mu g/dl$	ng/ml	g/l	mg/l		mU/ml	UI/l	UI/l	UI/l	UI/l	%	pg/ml
1	M	17,2	50	86	30	5,8	5,9	215	50,9	150	230	45	2,8	1	0,62	9,6	27	12	28	233	8,4	6,1
2	F	14,3	40	91	32	4,4	5,5	174	43,1	88	302	70	3	1,5	0,83	10,6	18	11	14	120	12,6	2,1
3	F	14,1	41	90	31	4,5	8,6	348	66,4	70	390	85	2,5	1,63	0,86	7,6	19	11	12	99	20,1	2,1
4	F	13,5	39	94	33	4,0	7,1	202	71,3	120	380	77	2,7	1,2	0,63	5,1	16	11	11	115	15,9	2,3
5	M	14,7	44	84	28	5,2	5,2	221	63,4	96	284	49	2,3	0,99	0,58	8,5	31	21	20	214	10,2	2,4
6	M	15,6	45	84	29	5,0	4,1	152	84,1	125	377	52	3,2	1,3	0,76	6,0	33	41	37	161	16,3	6,8
7	M	15,6	46	89	30	5,2	6,9	205	57,7	132	408	106	3,1	1,5	0,75	3,5	23	22	28	173	14,4	5,4
8	M	15,7	46	87	30	5,3	6,5	236	84,4	99	323	91	2,7	0,95	0,5	8,0	27	35	17	178	17,3	5,7
9	F	12,4	37	90	31	4,2	7,4	187	42	103	307	33	2,8	1,14	0,76	8,2	13	7	13	105	12,6	2,4
10	F	13,	37	89	31	4,2	4,3	225	47,7	76	253	43	2,1	0,9	0,56	7,0	12	6	10	142	10,5	7,5
11	F	13,6	40	81	27,4	4,9	5,4	150	535	115	330	67	3,4	1,68	0,93	7,8	18	13	11	107	11,2	2,0
	H	14-18	42-52	80-96	27-32	4,5-6,1	4-10	150-400	27-135	53-167	1150-400	20-280	2-3,6	0,83-1,76		2,6-34	10-35	10-45	10-35	65-300	6,4-25,5	<15,6
	M	12-16	37-47	81-99	27-32	4,2-5,4	4-10	150-400	27-135	49-151	150-400	10-140	2-3,6	0,83-1,76		2,6-34	10-35	10-45	7-30	65-300	6,4-25,5	<15,6

Tabela 14: Grupo de pacientes com anemia microcítica e hipocrômica

OBS: outras dosagens realizadas para investigação de hemoglobinopatia:

Paciente N°3: dosagens de HbA2=4,3% (V.R.: 1,5-3,4%) e HbF=3% (V.R.:≤2,0%)

Classific.	N	Id	Sx	CDC	Hb	Ht	VCM	HCM	RBC	WBC	PLT	RTC	MFI	Fe	TIBC	FS	Tf	STfr	EPO	AST	ALT	GGT	ALP	INF-G	CD4	CD8	CD4/CD8	CV	Drogas
NC.	1	30	M	C3	11,8	37,6	78	24,4	4,84	3,5	85	18	10,4	170	498	160	2,3	3,1	5,5	115	50	316	419	91,2	105	785	0,13	1800	AZT; 3TC;IDN
NC	2	32	M	C2	13,6	44,1	76	23,5	5,8	7,1	188	83,8	14,2	177	313	572	1,7	1,7	11	83	138	173	309	96,5	494	1827	0,27	19000	D4T;3TC;Nelfinavi
β-Tal..	3	31	M	B3	12,7	39,9	78	24,6	5,1	9,7	114	40,9	11,5	65	444	14	2,5	0,2	25	38	23	26	301	84,9	325	1262	0,26	30000	AZT;3TC;AcFolico
NC	4	25	M	C3	8,7	26,2	79	26,1	3,3	3,6	222	34,8	22,4	146	472	1600	1,1	0,7	16,5	17	15	137	238	95,5	29	228	0,13	650000	D4T;DDI;Nelfinavi
NC	5	36	M	C3	12,2	34,7	78	27,4	4,5	1,36	108	19,2	8,29	79	539	2060	1,5	1,7	9,5	24	24	28	158	213,3	55	838	0,07	1900	AZT;3TC
ADC	6	24	F	C3	11,5	33,6	80,3	27,8	4,2	10,9	267	27,2	5,14	48	141	3760	1,3	1,2	13,3	32	19	209	747	170,3	66	799	0,08	15000	AZT;DDI;Indinavir
NC.	7	37	F	C3	9,4	28,1	79,3	26,6	3,54	4,48	167	24,2	36,8	51	183	528	1,2	5,6	110	78	91	211	302	27,8	21	28	0,8	130000	AZT;D4T;Indinavir
ADC	8	36	M	C3	9,3	28,7	72	23,2	4,0	5,8	458	34	13,7	19	200	49,7	2,3	1,7	37,6	51	78	82	266	115,9	111	403	0,28	1700	D4T;3TC
ADC	9	33	M	C3	10,5	31,9	75,8	25,1	4,2	7,8	152	34,7	12	50	201	1070	1,2	1,1	3,2	14	7	59	122	19,1	2000	951	2,1	80	AZT;3TC; nelfinavi
ADC	10	28	M	C3	8,3	24,6	78	26,3	3,15	2,5	157	58,4	18,8	29	196	835	0,8	1,9	45,6	28	13	147	496	112,8	10	668	0,01	93000	AZT;DDI;3TC
ADC	11	30	M	C3	8,4	24,5	78	26,8	3,15	2,5	52	15,6	13,6	49	162	3670	0,9	0,9	7	21	24	141	326	101,9	4	148	0,03	520	ANFOTERICINA
ADC	12	47	M	C3	12,5	36,5	78	26	3,93	7,65	196	25	8,78	47	158	241	2,9	1,2	7,8	56	80	52	168	21,7	713	643	1,11	230	DDI;AZT;Nelfinavi
AF	13	39	M	C3	8,11	25,6	72,6	23	3,53	5,58	18,3	61,2	20	22	498	9,3	3,6	1,2	77,4	18	9	50	125	49,4	165	1097	0,15	16000	DDI;AZT;Nelfinavi
AF	14	52	F	A3	11,1	35,3	75	23,3	4,74	5,4	331	96,6	17,1	40	451	22,7	2,5	1,2	20,9	31	17	76	499	71,7	104	165	0,63	Indetect.	D4T;3TC

Tabela 15: Grupo de pacientes com anemia macrocítica e hiperocrômica

OBS: outras dosagens realizadas para investigação de anemia megaloblástica:

Paciente N°8: dosagem de Ác. Fól=1,5 ng/ml (VR: 3,0-17,5ng/ml); Vit.B12= 140 pg/ml (VR:271-966ng/ml)

Paciente N°3: dosagem de Ác. Fól=2,0 ng/ml ; Vit.B12= 130 pg/ml

Classific.	N	Id	Sx	CDC	Hb	Ht	VCM	HCM	RBC	WBC	PLT	RTC	MFI	Fe	TIBC	FS	Tf	sTfr	EPO	AST	ALT	GGT	ALP	INF-G	CD4	CD8	CD4/CD8	CV	Drogas
NC.	1	47	M	C2	12,9	39,4	110	36	3,58	4	189	21,6	6,1	220	616	105	2,6	2,1	8,7	15	18	36	113	75,4	266	943	0,28	Indetect.	AZT; 3TC;IDV
DH	2	34	M	B3	13,9	41,7	101	33,6	4,1	6,9	176	97,9	18	220	383	707	1,8	0,4	10,7	130	101	142	340	86	144	678	0,21	XX	AZT; 3TC;AcFol; Sulfa
AM	3	57	M	C3	13,4	41,1	119	38,8	3,46	3,8	195	34,7	13,9	99	329	1280	1,9	2,4	20,8	38	39	183	229	121	152	677	0,22	160000	AZT;DDI;3TC; AcFol
DH e SHA	4	29	F	A1	10,7	32,3	107	35,6	3,02	2,7	148	34,3	16,2	88	607	13,1	3,9	2	117	12	5	69	269	97,6	203	639	0,32	120000	AZT; 3TC;NRP
DH	5	32	M	C3	12,8	38,6	99,9	33	3,89	2,9	151	33,4	12,6	108	348	1290	1,8	0,4	17,7	17	27	71	254	247	7	483	0,01	190000	DDI;AZT;NFV
DH	6	36	M	C3	12,6	37,9	99,7	32,8	3,8	6	248	29	12	158	322	1220	3,6	2,5	21	140	200	582	806	52,7	11	54	0,2	240	D4T;3TC;NFV
NC	7	33	M	C3	13,6	42	108	34,8	3,91	6	199	28	11,9	91	300	111	2,3	0,9	10,8	21	27	26	173	123	276	1372	0,2	120000	D4T;3TC;NFV, AcFol; B12
AM	8	60	M	C3	7,3	21,6	126	42,6	1,72	1,2	177	36	19,4	66	290	1030	1,2	2,5	20,5	22	12	29	180	98,2	14	530	0,02	660000	AZT;3TC;IDV
DH	9	33	M	C3	13,0	39,8	108	35,5	3,67	3	201	61,3	12,7	175	448	306	1,9	3,3	11,4	25	14	41	119	212	120	1909	0,06	83000	DDI;AZT
DH	10	27	M	C3	9,95	28,7	98,1	34,2	3,09	6,5	111	53	10,1	80	102	1265	0,4	2,1	7,6	241	95	593	2169	112	2	125	0,02	183000	3TC;NFV
DH	11	33	M	C3	7,9	21,6	97,4	33,4	2,36	4,91	21	18,2	11,7	77	86	1330	0,6	2,3	230	216	130	39	281	116	44	528	0,08	190000	AZT;3TC;IDV
DH	12	52	M	C3	10,5	30,3	101	35,1	2,99	4,4	46	60,5	12,3	189	151	3360	0,9	2,9	110	233	104	151	253	72,3	68	1122	0,06	150000	DDI;AZT;IDV
DH	13	33	M	A2	13,8	41,1	109	36,7	3,76	4,1	151	17,5	10,4	229	637	339	2,8	1,7	15,8	33	32	41	177	121	466	784	0,59	610	AZT;3TC;DDI
NC	14	50	M	C3	13	38,3	114	38,6	3,37	5	238	32,7	12,6	108	231	506	1,6	1,3	18,6	18	20	23	222	104	300	1066	0,28	7500	D4T;3TC;EFV
NC	15	47	M	C3	12,7	37,5	120	40,7	3,12	5	166	49,5	17,3	125	375	862	1,7	1,9	27,3	14	6	23	224	78,1	320	547	0,59	Indetect.	AZT;3TC;DDI
DH	16	38	M	C3	13,8	41,4	98	32,7	4,2	5	244	49	13	77	273	296	2,8	3,3	21,6	117	108	415	428	137	53	846	0,06	200000	AZT;3TC;DDI
DH	17	43	M	C3	13,4	41	111	35,9	3,74	4,7	373	11,1	8,65	127	185	2350	1,9	4	5,4	33	25	391	277	63,9	560	789	0,7	9400	AZT;3TC;ETB;ISN
DH	18	33	F	C3	9,4	27,9	117	39,4	2,39	6,5	237	68,9	14,3	161	417	176	1,3	2,5	33,2	73	19	129	491	99,1	181	1504	0,12	Indetect.	DDI; D4T;Bactr
DH	19	49	M	C3	12,3	37,8	115	37,3	3,3	4	335	67,6	8,1	172	350	167	2,4	1,3	24,5	57	48	142	301	92,8	160	670	0,24	150000	DDI;AZT;NFV
ADC	20	35	M	C3	11,5	32	102	36,7	3,13	10,6	317	17,8	14	40	261	238	1,9	2,1	16,2	19	8	48	146	124	56	401	0,1	1200000	DDI;AZT;NFV
ADC e SHA	21	38,1	M	C3	7,94	23,4	107	36,	2,19	3,65	86	142	17,2	2	180	629	1,1	2,3	26,6	34	36	26	100	80,9	124	468	0,3	150000	DDI;AZT;Sulfa
DH e SHA	22	27	F	C3	7,9	23,3	100	33,7	2,33	2,6	123	18,9	9,22	234	534	2330	1,6	2,1	205	63	35	214	236	110	228	701	0,33	880	DDI;AZT

Tabela 16: Grupo de pacientes com anemia normocítica e normocrômica

OBS: dosagens realizadas para investigação de anemia hemolítica:

Paciente N°7: BI = 0,6 mg/dl (VR: 0,2-0,8 mg/dl)

LDH = 370 UI/L (VR: 150-450 UI/L)

Haptoglobina = 130 mg/dl (VR: 30-230 mg/dl)

Classific.	N	Id	Sx	CDC	Hb	Ht	VCM	HCM	RBC	WBC	PLT	RTC	MFI	Fe	TIBC	FS	Tf	sTf	EPO	AST	ALT	GGT	ALP	INF-G	CD4	CD8	CD4/CD8	CV	Drogas
HA(B)	1	28	M	C3	7,9	22	95,5	34,4	2,3	1,3	16,5	20,9	20,8	88	181	1780	1,2	1,2	63,8	164	93	237	541	119,3	137	761	0,2	100000	AZT; 3TC;IDN
HA(B)	2	41	M	C3	9,1	26,4	83,5	28,8	3,16	3,19	25,8	33	7,31	157	176	1980	1,6	0,9	60,4	211	224	150	1124	224,5	2	211	0,01	375000	AZT; 3TC;IDN
SHA	3	35	M	C3	9,9	31	94	30,2	3,3	2,8	147	12,6	10,1	75	103	605	1,5	2	27,4	134	301	563	739	115,4	144	601	0,2	280000	AZT; 3TC;IDN
SHA	4	38	M	C3	11,6	35,5	91	29,7	3,9	0,6	95	24	9,37	132	272	1370	1,2	1,7	2,9	16	10	28	136	99,2	183	494	0,37	3100	DDI;AZT;NFV
SHA	5	38	M	B2	13,4	40,2	89	29,6	4	3	126	24,3	6,13	119	382	387	2,2	0,9	11	31	30	32	154	92,8	102	628	0,16	56000	DDI;AZT;NFV
SHA	6	38	M	A2	9	27,1	88	29,2	3,07	1,4	146	24,1	7,73	142	155	93,8	2,3	0,9	11,6	38	41	47	180	95,9	349	1288	0,27	190000	D4T;3TC;NFV
NC	7	32	M	C3	9,7	28,8	94	31,6	3	4,9	537	139	14,4	302	403	1890	1,5	2,3	50,6	39	21	103	314	128	150	721	0,2	Indetect.	D4T;3TC;NFV
NC	8	25	F	A1	11,5	35,2	87	28,4	4,05	9,3	201	25,7	8,33	41	465	14	3,2	2,2	27,4	93	149	43	160	46,8	586	1402	0,42	55	AZT;3TC;IDV
ADC e HA(B)	9	29	M	C3	7,37	21,2	85,3	29,7	2,48	3,03	10,8	26,2	15,9	43	162	1500	0,5	1,6	58,2	23	23	40	502	168,7	10	236	0,04	XX	DDI;AZT;SQV
ADC e SHA	10	29	M	C3	8,2	24	88,6	30,3	2,7	3,9	93,1	42	15,2	16	150	7580	0,9	2,6	55,8	58	21	126	687	98,6	10	285	0,03	70000	3TC;NFV
ADC	11	29	M	A1	13,6	41,6	87	28,6	4,76	5,3	159	16,8	2,86	46	244	285	1,9	4,8	6,4	86	83	141	156	27,3	602	480	1,6	1000	AZT;3TC;IDV
ADC	12	30	M	C3	10,7	30,9	85,9	29,7	3,6	5,06	123	31,6	18,8	22	199	1320	1,4	6,6	23,1	71	33	98	122	98,8	73	788	0,09	150000	DDI;AZT;IDV
ADC	13	31	M	C3	9,43	26,2	92,6	33,3	2,83	5,18	316	31,9	17,5	20	152	415	1,5	0,6	133,5	12	10	93	163	121,7	28	216	0,13	3400	AZT;3TC;DDI
ADC	14	23	M	C3	10,9	32,4	88	29,6	3,68	20,1	559	36,3	6,67	15	86	1000	0,6	1,4	4,8	246	129	533	852	218,1	12	471	0,02	115000	D4T;3TC;EFV
ADC	15	42	F	C3	6,1	18,2	93	30,9	1,96	8,4	79	63,9	15	46	174	840	1,6	1,1	131	23	27	63	367	18	548	162	3,3	400	AZT;3TC;DDI
ADC	16	32	M	C3	7,9	23,3	89,8	30,7	2,59	3,43	512	44,2	25,2	29	160	1370	0,9	2,7	45,2	27	29	71	181	97,7	123	619	0,2	57000	AZT;3TC;DDI
ADC	17	30	M	C3	11	33	89,6	30,6	3,7	9,2	252	84,4	14	44	162	340	2	1	13,4	140	179	87	270	97,8	124	947	0,13	150000	AZT;3TC;ISN
ADC	18	32	M	C3	9,26	25,1	84,7	31,2	2,97	9,96	133	41,8	11,2	32	138	1530	1	2,1	19,4	23	16	193	548	92,7	210	957	0,22	11500	D4T;3TC;NFV
NC	19	37	M	C3	13,4	41,3	90	29,1	4,6	8,4	426	40,3	11	53	305	139	1,8	1	13,4	19	16	31	284	92,8	201	1142	0,18	5100	DDI;AZT;NFV
NC	20	41	M	C3	12,9	39	91	30,1	4,28	5,6	115	56,5	10,7	90	390	424	1,6	1,3	5,1	163	98	64	297	79,6	194	935	0,21	110000	Sulfa;D4T;NFV
NC	21	25	M	C3	9,7	27,7	86	30,1	3,2	5,2	230	18,8	14,1	64	235	358	1,4	3,1	44,7	17	24	25	187	119,6	209	1129	0,19	10000	DDI;AZT;Sulfa
NC	22	33	F	C3	10	31	83	26,9	3,7	6,1	261	81,9	22,4	68	430	210	2,1	1,2	31,1	67	57	242	439	201	57	765	0,07	620000	DDI;AZT
NC	23	49	M	A1	12	36,2	91	30	3,98	4,7	245	27	7,55	136	476	298	1,7	0,4	17,2	13	16	30	245	49,1	309	490	0,63	19000	AZT;3TC;IDV
ADC	24	24	M	C3	11,7	35,3	96	32	3,67	3,1	152	28,7	12,7	47	324	1060	1,1	1,7	37,5	140	82	219	284	246,5	10	559	0,01	200000	AZT;3TC;IDV
NC	25	34	M	C3	10,3	29,9	89,2	30,7	3,36	14	164	40,6	6,94	78	219	1440	1,5	0,2	13,8	78	99	610	807	119,4	70	566	0,01	94000	AZT;3TC;IDV
NC	26	29	M	A1	10	28,9	82,5	28,5	3,51	13,3	268	98,7	9,5	89	225	219	0,6	3	16,1	205	156	186	1697	26,4	1035	1715	0,6	1500	D7;ETB;ISN
NC	27	31	M	C3	12,5	37,2	85,7	28,8	4,34	4,13	237	39,6	14,5	58	320	522	2,7	0,6	12,6	27	28	42	119	181,7	153	1124	0,14	72000	AZT;3TC;Sulfa; AcFol
NC	28	53	M	B2	13,1	40,2	95	31,1	4,22	7,3	192	34,1	10,6	154	382	195	2	1,2	27,3	13	16	15	201	29,1	619	650	0,95	150	AZT;3TC;IDV
NC	29	27	M	C3	9,6	29	88	29,3	3,27	5,1	321	47,2	16,2	91	229	291	1,4	0,9	42	22	9	181	264	24,4	70	114	0,61	180000	AZT;3TC;Sulfa; AcFol
NC	30	32	F	A1	11,7	36,8	85	27,2	4,31	5,8	104	53	10	148	399	36,5	2,2	0,7	9,9	16	13	27	176	59,2	557	713	0,78	350	AZT;3TC;ISN
NC	31	33	M	C3	13,4	40,7	84	27,6	4,87	4,5	165	21,8	8,25	164	420	122	0,8	1,3	6,4	131	142	1131	1605	219,1	18	687	0,03	140000	DDI;AZT;Sulfa
NC	32	42	F	A2	11	35,1	86	28,9	4	6,5	231	44,7	11	198	331	54,4	1,8	1,6	8,9	29	29	30	209	139	551	962	0,57	800000	AZT;3TC;IDV
NC	33	45	F	C3	11,8	35,8	94	30,9	3,8	8,7	165	17	3,1	143	416	27,8	2,4	3	10,2	27	28	30	179	47,8	274	1208	0,2	1500	AZT;3TC;IDV

Tabela 17: Grupo de pacientes HIV positivo sem anemia

N	Id	Sx	CDC	Hb	Ht	VCM	HCM	RBC	WBC	PLT	RTC	MFI	Fe	TIBC	FS	Tf	sTfr	sTfR/Log FS	EPO	AST	ALT	GGT	ALP	INF-G	CD4	CD8	CV	Drogas
1	36	F	C2	16,2	49,3	96	31,7	5,1	6	119	31,4	10,3	57	173	93,3	2,3	1	0,52	10,7	98	87	78	196	XXX	251	701	340000	AZT; 3TC;NFV
2	44	M	B3	15,2	46,1	107	35,4	4,3	4,9	118	40,8	8,7	90	276	190	1,3	1,7	0,74	13,2	25	27	65	187	XXX	144	481	210000	AZT; DDI; IDV;Bactrim
3	49	M	A2	14,4	43,2	111	37	3,89	4,8	150	20,1	6,13	148	490	85	2,1	1,8	0,95	15,5	25	19	15	192	115	438	1585	7300	IDV; Biovir
4	43	F	C3	13,4	40,9	85,9	28,2	4,7	5,6	101	45	5,69	145	635	29,6	2,5	3	2,	10,1	30	22	23	191	111	107	977	370000	D4T; 3TC; EFV
5	23	F	A1	13,8	41,9	116	38,1	3,6	6,1	230	39,5	9,95	117	303	30,4	2,1	1,3	0,87	20,5	23	19	21	130	28,2	750	985	2300	AZT; 3TC
6	35	M	A3	15,4	48,2	90	28,8	5,3	6,1	47	14,3	6,64	122	367	108	4,9	3,2	1,6	122	23	14	28	191	XXX	166	1636	1200	AZT; 3TC; EFV
7	31	M	C3	15,5	46,1	111	37,3	4,15	4,1	119	17,4	5,85	270	360	346	1,4	1,7	0,68	10,6	47	57	145	309	XXX	103	557	0	AZT; DDI; RTV
8	35	M	C3	14,9	44,4	99	33,2	4,49	2,8	52	12,8	4,29	132	274	424	1,5	0,8	0,3	5,3	44	16	236	349	116	158	444	580000	NFV; D4T; DDI
9	39	F	A1	12,7	39,2	103	33,3	3,8	7,1	248	38,9	10	173	486	11,3	3,4	2,1	2,1	31,9	21	16	17	217	23,4	1187	762	0	D4T; 3TC; NFV
10	25	F	A2	12,6	37,1	102	34,6	3,6	11	416	53,4	19	213	530	36	2,5	2,3	1,53	35,8	15	12	40	248	XXX	715	1373	3800	Biovir; NFV
11	39	M	A2	14,8	44,8	113	37,4	3,9	6,6	115	26,1	7,66	72	594	72	2,7	1,7	0,84	11	26	28	12	232	XXX	547	920	0	AZT; 3TC; IDV
12	36	M	B3	14	41,9	120	40	3,5	5,1	223	25,8	10,1	150	562	85,6	2,4	3	1,6	23,2	18	18	25	175	118	457	950	0	AZT; 3TC; IDV
13	49	M	B2	16,7	50,1	112	37,5	4,4	4,6	217	59,9	13,2	380	663	95	2,4	2,9	1,5	14,3	26	34	37	184	XXX	563	752	0	AZT; 3TC; IDV
14	39	M	B2	15,5	43	123	45	3,4	7,8	188	65	14	227	368	198	2,4	2,5	1,08	61,3	24	20	20	250	18,9	490	426	0	AZT; 3TC; IDV
15	36	F	A2	13	39,4	118	38,5	3,38	5,6	180	13	6	91	325	52,1	1,8	2,8	1,64	7,3	31	39	147	271	XXX	290	334	0	AZT; DDI
16	43	M	A3	17,9	53,3	112	37,6	4,7	5,4	175	109	24	202	519	1280	1,4	2,3	0,74	2,9	29	35	25	228	95	426	602	5900	IDV; AZT; 3TC
17	44	M	C3	15,2	45,2	112	37,2	4	4,7	163	59,3	13,9	131	630	89,4	2,7	1	0,51	29,9	91	64	305	425	XXX	261	1361	6000	D4T; DDI; NFV
18	31	M	C3	15	44,2	108	36,5	4	5,4	175	34,5	14,7	98	192	473	0,7	1,3	0,5	13,5	60	96	194	198	117	319	1157	9900	AZT; DDI; NFV
19	39	M	C2	16,2	47,8	107	36,2	4,5	3,6	101	79,2	10,5	85	458	79,5	0,7	1,6	0,84	3,9	170	180	150	283	180	457	429	0	AZT; DDI
20	39	M	A1	15,1	44,4	120	40,8	3,7	7,6	154	41,2	15,1	151	660	192	2,6	0,3	0,13	10,2	39	34	35	166	XXX	1162	1200	750	AZT; DDI; IDV
21	34	M	A2	14,1	42,3	101	33,9	4,1	4,3	159	49,1	15,6	127	265	293	0,8	1,1	0,44	25,5	30	33	21	151	95,7	455	706	190	D4T; DDI; AZT
22	30	M	B1	14,6	42,6	114	38,3	3,8	5,8	208	71,7	12	239	447	119	2,1	1,5	0,75	16	19	21	19	185	XXX	612	795	2100	AZT; DDI
23	31	M	C3	14,1	42,6	111	37	3,8	5	171	34,5	9,71	178	629	514	3,9	2,4	0,88	36,5	47	49	171	463	XXX	295	942	2500	AZT; 3TC
24	31	M	A2	15	44,6	109	36,6	4,1	9,9	323	43,4	10,3	98	749	78	2,7	1,6	0,84	12,5	37	30	23	149	XXX	271	2000	1900	AZT; 3TC; NFV
25	47	F	A1	13,6	40,3	103	34,7	3,9	9,1	260	72,2	17,2	126	420	31	2,9	3	2,	37,8	30	21	51	142	XXX	849	1502	0	D4T; 3TC;IDV
26	40	M	A3	16,7	47	102	36,2	4,6	7,5	31	27	10,7	304	418	110	2,4	1,8	0,9	10,7	76	52	290	326	132	86	753	XXX	D4T; DDI; IDV
27	45	M	A1	14,8	40,9	115	41,7	3,55	5	133	97	18	216	344	126	3,2	0,3	0,14	47,5	24	19	27	315	22	471	583	0	AZT; 3TC; IDV
28	18	M	B3	15	44,2	94,6	32,1	4,6	3,5	114	67	12,1	303	504	243	1,8	1,2	0,5	52,5	17	19	58	164	21	450	605	650000	DDI; D4T; RTV
29	31	M	A3	14,5	41,7	88,6	30,7	4,7	5,7	139	56	14,1	51	269	198	1,7	0,9	0,4	9,3	28	20	27	179	211	60	1063		AZT; DDI
30	58	F	C3	12,5	36,9	112	37,8	3,31	2,66	170	27	9,9	129	397	222	2,6	0,9	0,4	20,4	23	13	87	418	115	288	841	31000	AZT; 3TC; NFV
31	33	F	A3	13,1	39,8	102	33,8	3,87	5,4	207	56	15	168	502	25,1	3,1	1,2	0,86	7,2	21	12	13	231	112	217	709	950	AZT; DDI; IDV
32	28	F	A1	13	39,5	98	32,1	4,5	8,2	194	35,3	9,95	198	504	12,3	2,7	0,5	0,46	12,9	13	23	27	114	XXX	829	633	1400	SEM USO
33	38	M	A2	16,5	49,3	100	33,5	4,9	7,2	314	84,8	12,3	22	291	203	1,1	1,1	0,48	4,7	31	32	132	172	XXX	495	949	200000	AZT ; DDI
34	34	M	A1	15	45	102	36	4,7	5	256	95	8,9	182	672	182	1,7	1,1	0,48	23,4	21	22	45	247	47,6	402	608	0	AZT; 3TC; IDV
35	27	F	A2	13,1	40,4	97	31,3	4,18	2,9	97	18,3	5,69	196	349	351	2,2	1	0,4	5,6	97	95	48	173	XXX	88	452	210000	AZT; 3TC

N	Id	Sx	CDC	Hb	Ht	VCM	HCM	RBC	WBC	PLT	RTC	MFI	Fe	TIBC	FS	Tf	sTfr	sTfr/Log FS	EPO	AST	ALT	GGT	ALP	INF-G	CD4	CD8	CV	Drogas
36	36	F	C3	12,3	39,8	86	26,6	4,6	7,4	333	23,6	6,8	70	276	170	1,6	2	0,9	13,9	19	13	29	220	XXX	207	1296	400	AZT; IDV; Bactrim
37	52	M	C3	14,3	42,9	116	38,6	3,7	5,2	179	27,6	5	252	453	96	2,4	0,7	0,37	16,9	30	33	113	249	XXX	467	1721	0	RTV; Biovir; AZT; 3TC; Bactrim
38	33	F	A3	12,3	38,5	90	28,9	4,26	4	214	38,9	9,09	51	619	53,7	2,9	0,4	0,23	13,9	34	37	201	239	XXX	163	764	290000	3TC; Bactrim
39	38	M	A2	14,2	42,3	91	30,5	4,6	8,9	193	28,8	12,6	94	272	190	1,8	1	0,43	5,3	17	20	13	256	XXX	465	787	96000	AZT; DDI
40	31	F	A1	12,3	36,8	86	28,8	4,25	5,3	196	32,2	6,6	165	387	58,8	2,6	1,2	0,66	8	30	31	31	147	XXX	583	869	1800	SEM USO
41	59	M	A1	14,5	43,6	89	29,6	4,9	5,8	181	40,2	9,85	128	435	63,6	2	2,7	1,5	7,6	61	94	57	131	XXX	658	1426	0	SEM USO
42	29	F	C3	15,1	45	106	35,7	4,2	4,4	135	63,3	10,1	156	290	43,6	1,4	2,6	1,62	4,2	37	71	111	176	113	318	840	290	DDI; D4T; NVP

Tabela 18: Grupo de pacientes com ADC

N	Id	Sx	CDC	Hb	Ht	VCM	HCM	RBC	WBC	PLT	RTC	MFI%	Fe	TIBC	FS	Tf	sTfR	sTfR/log FS	EPO	AST	ALT	GGT	ALP	INF-G	CD4	CD8	CV
1	24	F	C3	11,5	33,6	80,3	27,8	4,2	10,9	267	27,2	5,14	48	141	3760	1,3	1,2	0,34	13,3	32	19	209	747	170,3	66	799	15000
2	36	M	C3	9,3	28,7	72	23,2	4,0	5,8	458	34	13,7	19	200	49,7	2,3	1,7	1,0	37,6	51	78	82	266	115,9	111	403	1700
3	33	M	C3	10,5	31,9	75,8	25,1	4,2	7,8	152	34,7	12	50	201	1070	1,2	1,1	0,4	3,2	14	7	59	122	19,1	2000	951	70
4	28	M	C3	8,3	24,6	78	26,3	3,15	2,5	157	58,4	18,8	29	196	835	0,8	1,9	0,65	45,6	28	13	147	496	112,8	10	668	93000
5	30	M	C3	8,4	24,5	78	26,8	3,15	2,5	52	15,6	13,6	49	162	3670	0,9	0,9	0,36	7	21	24	141	326	101,9	4	148	520
6	47	M	C3	12,5	36,5	78	26	3,93	7,65	196	25	8,78	47	158	241	2,9	1,2	0,5	7,8	56	80	52	168	21,7	713	643	230
7	29	M	C3	7,37	21,2	85,3	29,7	2,48	3,03	10,8	26,2	15,9	43	162	1500	0,5	1,6	0,5	58,2	23	23	40	502	168,7	10	236	XXX
8	29	M	C3	8,2	24	88,6	30,3	2,7	3,9	93,1	42	15,2	16	150	7580	0,9	2,6	0,7	55,8	58	21	126	687	98,6	10	285	71000
9	29	M	A1	13,6	41,6	87	28,6	4,76	5,3	159	16,8	2,86	46	244	285	1,9	4,8	2,0	6,4	86	83	141	156	27,3	602	480	1000
10	30	M	C3	10,7	30,9	85,9	29,7	3,6	5,06	123	31,6	18,8	22	199	1320	1,4	6,6	2,12	23,1	71	33	98	122	98,8	73	788	150000
11	31	M	C3	9,43	26,2	92,6	33,3	2,83	5,18	316	31,9	17,5	20	152	415	1,5	0,6	0,23	134	12	10	93	163	121,7	28	216	3400
12	23	M	C3	10,9	32,4	88	29,6	3,68	20,1	559	36,3	6,67	15	86	1000	0,6	1,4	0,46	4,8	246	129	533	852	218,1	12	471	115000
13	42	F	C3	6,1	18,2	93	30,9	1,96	8,4	79	63,9	15	46	174	840	1,6	1,1	0,4	131	23	27	63	367	18	548	162	400
14	32	M	C3	7,9	23,3	89,8	30,7	2,59	3,43	512	44,2	25,2	29	160	1370	0,9	2,7	0,87	45,2	27	29	71	181	97,7	123	619	57000
15	30	M	C3	11	33	89,6	30,6	3,7	9,2	252	84,4	14	44	162	340	2	1	0,4	13,4	140	179	87	270	97,8	124	947	150000
16	32	M	C3	9,26	25,1	84,7	31,2	2,97	9,96	133	41,8	11,2	32	138	1530	1	2,1	0,65	19,4	23	16	193	548	92,7	210	957	11500
17	24	M	C3	11,7	35,3	96	32	3,67	3,1	152	28,7	12,7	47	324	1060	1,1	1,7	0,56	37,5	140	82	219	284	246,5	10	559	200000
18	35	M	C3	11,5	32	102	36,7	3,13	10,6	317	17,8	14	40	261	238	1,9	2,1	0,87	16,2	19	8	48	146	123,9	56	401	1200000
19	38,1	M	C3	7,94	23,4	107	36,2	2,19	3,65	86	142	17,2	2	180	629	1,1	2,3	0,82	26,6	34	36	26	100	80,9	124	468	150000

N, identificação; Id, idade; Sx, sexo; CDC, classificação CDC; Hb, hemoglobina; Ht, hematócrito; VCM, volume corpuscular médio; HCM, hemoglobina corpuscular média; WBC, contagens de células brancas; PLT, plaquetas; RTC, reticulócitos; MFI%, índice médio de fluorescência; Fe, ferro sérico; TIBC, capacidade de ligação do ferro total; FS, ferritina sérica; Tf, transferrina; sTfR, receptor solúvel da transferrina; EPO, eritropoietina; AST, aspartato aminotransferase; ALT, alanina aminotransferase; GGT, gama glutamil transferase; ALP, fosfatase alcalina; IFN-G, interferon-gama; CD4, contagens de linfócitos T CD4; CD8, contagens de linfócitos T CD8; CD4/CD8, relação CD4/CD8; CV, carga viral; drogas, drogas anti-retrovirais; AZT, azidotimidina; 3TC, lamivudina; DDI, didanosina; NFV, nelfinavir; D4T, estavudina; AcFol, ácido fólico; B12, vitamina B12; SQV, saquinavir; IDN, indinavir; RTV, ritonavir; XXX, dosagens não realizadas, Indetect, carga viral indetectável; Classificação laboratorial dos pacientes anêmicos de acordo com nosso protocolo: NC, não classificável; β -Tal, β -Talassemia; ADC, anemia de doença crônica; AF, anemia ferropriva; DH, doença hepática; AM, anemia megaloblástica; SHA, sugestivo de hipo/aplasia de MO; HA(B), hipo/aplasia de MO confirmado por biópsia.

AIDS PATIENT CARE and STDs

Editor-in-Chief

Jeffrey Laurence, M.D.
Director, Laboratory for
AIDS Virus Research
Weill Medical College of
Cornell University
411 East 69th St.
New York, NY 10021
Tel. (212) 746-2988
FAX (212) 746-8601
jlaurence@mail.med.cornell.edu

14 March 2002

Senior Consulting Editor

Robert C. Gallo, M.D.
Institute of Human
Virology
University of Maryland at
Baltimore
618 West Lombard St.
2nd Floor
Baltimore, MD 21201
Tel. (410) 706-8614
FAX (410) 706-8184

Helena Z. Wolf Grotto, M.D., Ph.D.

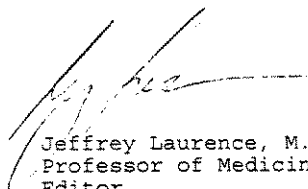
Dept. of Clinical Pathology
School of Medical Sciences
State University of Campinas
PO 6111-CEP 13083-970
Campinas, Sao Paulo, BRAZIL

Dear Dr. Grotto:

I am pleased to inform you that your manuscript on anemia of chronic disease in HIV infection would be acceptable for publication in our journal with some editorial changes. As IFN- γ measurements were only one part of the study, with a negative correlation, we would wish to change the title of your article to "HIV-related anemia of chronic disease: relationship to hematologic, immune and iron metabolism parameters, and lack of association with serum interferon- γ levels." Some minor modifications for syntax, grammar and journal style will also be made.

All future correspondence will come from the publishers. You will receive galley proofs approximately one month prior to publication.

Very truly yours,



Jeffrey Laurence, M.D.
Professor of Medicine
Editor

Penelope J. Hitchcock, D.V.M.
Chief, Sexually Transmitted
Diseases Branch
DMID, NIAID
Solar Bldg. Room 3A24
6003 Executive Blvd.
Bethesda, MD 20892-7630
Tel. (301) 402-0443
FAX (301) 402-1456

William Powderly, M.D.
Washington University
School of Medicine
4511 Forest Park Pkwy.
St. Louis, MO 63108
Tel. (314) 454-0058
FAX (314) 361-5231

Mark Wainberg, M.D.
Director, McGill AIDS Center
President, International AIDS
Society
Jewish General Hospital
3755, chemin côte-St-Catherine
Montreal, Quebec H3T 1E2 Canada
Tel. (514) 340-7536
FAX (514) 340-7537

Mary Ann Liebert, Inc.  publishers

Cidade Universitária, February 15, 2002.

To

Jeffrey Laurence, M.D.

Editor-in-chief, Director, Laboratory for AIDS Virus Research

Weill Medical College of Cornell University

411 East 69th Street, New York, NY 10021

Dear Dr. Laurence

We are sending two copies of the manuscript “Influence of IFN γ on iron metabolism in HIV patients with Anemia of Chronic Disease”, to be submitted for publication in **AIDS PATIENT CARE AND STDS** journal.

The material has not been published or submitted for publication elsewhere.

Looking forward to hearing from you,

Yours Sincerely,

Marina Ap. Salomé

Helena Z Wolf Grotto, MD, Ph.D.

Department of Clinical Pathology

School of Medical Sciences

State University of Campinas

PO 6111 – CEP 13083-970

Campinas, São Paulo, Brazil

Fax 55 19 32893273

Email: grotto@fcm.unicamp.br

**THE INFLUENCE OF IFN γ ON IRON METABOLISM IN HIV
PATIENTS WITH ANEMIA OF CHRONIC DISEASE**

Salomé, MA – Post-graduate student

Grotto, HZW - MD, Ph.D.

Running Title: Anemia of Chronic Disease in AIDS

Department of Clinical Pathology

School of Medical Science, State University of Campinas (UNICAMP), São

Paulo, Brazil

SUMMARY

Anemia of chronic disease (ACD) is frequent in HIV patients and its etiology is multifactorial. In a group of 111 HIV patients 19 individuals were diagnosed as ACD. Parameters related to iron metabolism, such as serum iron (SI), serum ferritin (SF), soluble transferrin receptor (sTfR) were correlated to Interferon γ (IFN γ) and results were compared to a group of 42 non anemic HIV patients. Measurements of erythropoietin (EPO), CD4/CD8 indices and reticulocyte (RTC) count were determined to verify aspects related to severity of disease and bone marrow response. The results showed higher SF concentrations in ACD patients and normal or slightly increased sTfR measurements in both groups. There was no correlation between IFN γ and SF and between IFN γ and sTfR determinations. Lower CD4/CD8 values were obtained in ACD and an inverse correlation was observed between IFN γ and CD4/CD8 in groups with and without anemia. RTC counts and EPO concentration were similar in both groups and immature RTC was increased in anemic patients, indicating an apparent attempt of marrow response to compensate the increased demand. According to our data it was not possible to confirm the IFN γ effect on iron disturbance in ACD, but results reinforced the important role of IFN γ in severity of HIV disease and the prominent immunologic system deterioration in HIV patients with ACD.

INTRODUCTION

Anemia is a common feature of HIV infection and its etiology is multifactorial. The causes of anemia are a direct effect of HIV infection of hematopoietic stem cells, effect of opportunistic infection, deficiency of iron, antiretroviral agents action or bone marrow infiltration by neoplasm.^{1,2,3} Viral infection has an impact on growth and differentiation of hematopoietic progenitor cells resulting from alterations of auxiliary cells involved in hematopoietic functions.⁴ Due to numerous factors contributing to anemia pathogenesis, it is sometimes difficult to determine the exact etiology and diagnosis of anemia, using routine laboratorial parameters.² On the other hand, it has been reported that HIV patients suffering from anemia have a higher risk for decreased survival.^{2,6}

The most frequent form of anemia in AIDS is the anemia of chronic disease (ACD), characterized by low serum iron (SI), low iron binding capacity, an increase in storage iron in marrow macrophages and elevated serum ferritin (SF). Inflammatory cytokines as tumor necrosis factor, interleukine 1 (IL- 1) and interferon gamma (IFN γ) play a central role in the pathogenesis of ACD, because they inhibit erythropoiesis in vitro.⁷ In addition, cytokines contribute to disturbances of iron metabolism related to the development of anemia under chronic inflammatory condition, leading to a withdraw of iron from sites of erythropoiesis and from blood stream to the storage compartments.⁸

The objective of our study was to evaluate hematological alterations in a group of positive HIV patients and to select a group of patients with ACD in order to analyze aspects related to iron metabolism and IFN γ action, comparing to a non anemic AIDS group.

PATIENTS AND METHODS

One hundred and eleven patients seen at Clinical Hospital of State University of Campinas (UNICAMP, São Paulo, Brazil) were studied. The project was approved by Ethic Committee of the School of Medical Sciences and all participants signed an informed consent.

According to classification proposed by the Centers for Disease Control (CDC)⁹, patients were subdivided in categories, depending on CD4⁺ cell number and clinical conditions.

Anemia was defined as a hemoglobin concentration of less than 14.0 g/dl for men and less than 12.0 g/dl for women. Hematological data, including reticulocyte (RTC) enumeration and Mean Fluorescence Index (MFI%) as representative of immature RTC population, were obtained using an automated hematological analyzer (Pentra 120 Retic/ ABX-Horiba, France). SI was determined by colorimetric method (Roche Diagnostics- USA). SF, soluble transferrin receptor (sTfR) and transferrin (Tr) levels were measured by immunonefelometry (Dade Behring, Germany). INF γ determinations were obtained by immunoenzymatic assay (R&D Systems, USA). Erythropoietin (EPO) concentrations were measured by quimioluminescent assay (Immulite/ DPC, USA).

All patients, but 3 without anemia, were receiving multi-drug regimen treatment with azidothymidine (AZT), didanosine (DDI), Lamivudine (3TC), as well as drugs used in the treatment of opportunistic infections.

For the statistical analysis the Mann-Whitney test was used. To verify the correlation between variables the Spearman correlation coefficient was carried on. The significance level was 5%.

RESULTS

According to adopted laboratories criteria, 69 from 111 subjects (62.2%) presented anemia.

Decreased SI levels, reduced or normal Tr values and increased SF determinations have diagnosed ACD. From 69 anemia patients, 19 presented such alterations and their hematological data are shown in Table 2.

SF determinations were higher in ACD patients than in non anemic group, although 9 from 42 non anemic patients have shown SF above normal limit. In both groups sTfR measurements were similar between both groups, and 15 (35.7%) individuals of control group and 8 (42.1%) of anemic group presented sTfR values above reference limit (Table 3). A weak inverse correlation ($r = -0.4430$) was observed between sTfR and SI in anemic group. There was no correlation between IFN γ and sTfR determinations in both groups.

As to variables related to erythropoiesis and activity of disease, lower CD4/CD8 values were obtained in the ACD group ($P = 0.0057$). There was no difference in IFN γ and EPO determinations between ACD and non anemic patients. Although RTC in absolute values were similar in anemic and non anemic patients groups, the percentage of immature RTC was higher in ACD patients ($P = 0.0259$) (Table 4).

An inverse correlation was observed between IFN γ and CD4/CD8 values, which was stronger in ACD group ($r = -0.8054$) than in patients without anemia ($r = -0.6470$). A moderate inverse correlation was observed between IFN γ and SI ($r = -0.5578$) only in non anemic patients, and between EPO and Hb levels in patients with ACD ($r = -0.6353$).

Low counting of CD4+ cells was positively correlated with low platelet count in non anemic patients ($r = 0.5075$).

DISCUSSION

Kreuzer and Rockstroh², in a review on pathogenesis and pathophysiology of anemia in HIV infection, emphasize the multiplicity of involved factors in anemia origin: a direct role of HIV on hematopoietic progenitors, effects of malnutrition and deficiency of vitamin B12 or iron, bone marrow infiltration by neoplastic diseases, opportunistic infections occurrence, the presence of anti-erythrocyte antibodies and the use of myelosuppressive drugs in multi-drug regimes. The complex network of factors involved in pathophysiology of HIV infection anemia makes difficult to have a definitive diagnosis by using conventional procedures.

Disturbances of iron metabolism are present in patients suffering from a chronic infection or tumor disease that develop a moderate anemia.⁸ Higher levels of SF have been demonstrated in patients with AIDS.¹⁰ The more advanced is the stage of the disease, the higher is the SF level.² Cytokines such as TNF α and IL-1 contribute to macrophage iron retention, probably as a result of increased ferritin transcription.¹¹ Iron accumulation has a deleterious effect in HIV patients evolution. Ferritin has an inhibitory effect on cellular proliferation and play a central role in oxidative stress, that can enhance HIV replication.¹²

The expression of transferrin receptor on the cell surface provides information on cell iron necessity. SF is frequently elevated in chronic disease and sTfR concentration has been used to distinguishing iron deficient anemia with inflammation from ACD, because patients with ACD express fewer cellular transferrin receptor.¹³ In our study ACD patients showed normal or slightly enhanced sTfR levels and there was no difference between anemic and non anemic groups. INF γ may depress sTfR expression by transcription and post-transcription mechanisms,⁸ but we did not observe a correlation between INF γ and sTfR determinations. Curiously a moderate inverse correlation was observed between INF γ and SI only in non anemic group. One explanation to low SI concentration in non anemic patients is that the reduction in SI levels may be a consequence of faster speed in the production of new viral particles in infected cells, according to Weinberg and Weinberg description.¹⁴

The inappropriately low RTC response in AIDS-related anemia is characteristic of the hypoproliferative anemia or ineffective hematopoiesis.¹⁵ A blunted EPO production and impaired ability of the erythroid progenitor to response to EPO are factors involved in the inadequate marrow compensatory process.¹³ In fact, none of the analyzed patients showed high RTC count, in spite of the anemia degree. Absolute RTC count was similar in both groups and 26% of patients showed reticulocytopenia, independent on anemia presence. On the other

hand, the percentage of immature RTC was higher in patients with anemia than in non anemic group. There is an apparent attempt of marrow response by releasing immature RTC to the peripheral blood circulation. However, the quantity of released RTC is insufficient to compensate the increased demand.

Inadequate EPO production in ACD was reinforced by our results, once EPO levels were not different in both groups. Most of patients showed normal or slightly increased EPO concentration. EPO levels in patients with ACD may be higher than normal, but not as high as those found in equally anemic iron deficient individuals, probably due to TNF, IL-1 and IFNs effects in erythropoiesis inhibition.¹³

Patients with anemia presented lower CD4+ lymphocyte counts than non anemic patients, showing a parallel progression of disease advancement and alterations of hematopoiesis, according to described data.¹⁶ The increasing of viral burden leads to HIV disease progression, which could cause anemia by increased cytokine-mediated myelosuppression.¹⁷

According to our analyses we could not confirm the association between IFN γ and parameters related to iron metabolism disturbance, such as ferritin and sTfR in HIV patients with ACD. However, patients with ACD showed worst immunologic system deterioration than non anemic patients and, at this point, IFN γ plays an important role.

REFERENCES

1. Bain BJ. Pathogenesis and pathophysiology of anemia in HIV infection. *Curr Opin Hematol* 1999; 6: 89-
2. Kreuzer KA, Rockstroh JK. Pathogenesis and pathophysiology of anemia in HIV infection. *Ann Hematol* 1997; 75: 179-287.
3. Evans RH, Scadden DT. Haematological aspects of HIV infection. *Baillière's Clin Haematol* 2000; 13: 215-230.
4. Moses A, Nelson J, Bagby Jr GC. The influence of human immunodeficiency virus-1 on hematopoiesis. *Blood* 1998; 91: 1479-1495.
5. Forsyth BW, Andiman WA, O'Connor T. Development of a prognosis-based clinical staging system for infants infected with human immunodeficiency virus. *J Pediatr* 1996; 129: 648-655.
6. Moore RD, Keruly JC, Chaisson RS. Anemia and survival in HIV infection. *J Acquir Immune Syndr Human Retrovirol* 1998; 19: 29-33.
7. Coyle TE. Hematologic complications of human immunodeficiency virus infection and the acquired immunodeficiency syndrome. *Med Clin N Am* 1997; 81: 449-470.
8. Weiss G. Iron and anemia of chronic disease. *Kidney Int* 1999; 55: S-12-S-17.
9. Curran JW. HIV e a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida: epidemiologia da infecção por HIV e AIDS/SIDA. In: Bennett and Plum. *Cecil Tratado de Medicina Interna*, 1997, 20ª ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro: 2037-2042.
10. Gupta S, Imam A, Licorish K. Serum ferritin in acquired immune deficiency syndrome. *J Clin Lab Immunol* 1986; 20: 11-13.
11. Brock JH. Iron homeostasis and macrophage function in inflammation. *Biometals* 1997; 10: 231.

12. Savarino A, Pescarmona GP, Boelaert JR. Iron metabolism and HIV infection: reciprocal interactions with potentially harmful consequences? *Cell Biochem Funct* 1999; 17: 279-287.
13. Means, Jr RT. Advances in the anemia of chronic disease. *Int J Hematol* 1999; 70: 7-12
14. Weinberg ED, Weinberg GA. The role of iron in infection. *Curr Opin Infect Dis* 1995; 8: 164-169.
15. Aboulafia DM, Mitsuyasu RT. Hematologic abnormalities in AIDS. *Hematol/Oncol Clin N Am* 1991; 5: 195-214.
16. Spada C, Treitinger A, Hoshikawa-Fujimura AY. HIV influence on hematopoiesis at the initial stage of infection. *Eur J Haematol* 1998; 61: 255-260.
17. Sullivan PS, Hanson DL, Chu SY, Jones JL, Ward JW, and the Adult/Adolescent Spectrum of Disease Group. Epidemiology of anemia in human immunodeficiency virus (HIV)- infected persons: results from the multistate adult and adolescent spectrum of HIV disease surveillance project. *Blood* 1998; 91: 301-308.

Reprint address:

Prof. Dra. Helena Z Wolf Grotto

Departamento de Patologia Clínica/ FCM/UNICAMP

Caixa Postal 6111, CEP 13083-970

Campinas,. São Paulo, Brasil

Fax 55 19 32893273

Email: grotto@fcm.unicamp.br

Table 1: Clinical characteristics of studied individuals

Number of patients	111
Males	84
Females	27
Age (Mean $\pm$ SD)	34.4 $\pm$ 7.3 years
CDC CLASSIFICATION	
A1= 15	B1= 1
A2= 12	B2= 4
A3= 7	B3= 5
	C1= 0
	C2= 4
	C3= 63

CDC: Centers for Disease Control.⁹

Table 2: Hematological data in 19 patients with ACD

n	CDC	Hb (g/dl)	MCV (fl)	MHC (pg)	WBC (x10 ⁹ /l)	PLT (x10 ⁹ /l)	RTC (x10 ⁹ /l)	MFI (%)	SI (μ g/dl)	Tr (g/l)	SF (μ g/l)	sTfR (mg/l)
1	C3	11.5	80.3	27.8	10.9	267	27.2	5.1	48	1.3	3760	1.2
2	C3	9.3	72.0	23.2	5.8	458	34.0	13.7	19	2.3	49	1.7
3	C3	10.5	75.8	25.1	7.8	152	34.7	12.0	50	1.2	1070	1.1
4	C3	8.3	78.0	26.3	2.5	157	58.4	18.8	29	0.8	835	1.9
5	C3	8.4	78.0	26.8	2.5	52	15.6	13.6	49	0.9	3670	0.9
6	C3	12.5	78.0	26.0	7.6	196	25.0	8.7	47	2.9	241	1.2
7	C3	7.3	85.3	29.7	3.0	10	26.2	15.9	43	0.5	1500	1.6
8	C3	8.2	88.6	30.3	3.9	93	42.0	15.2	16	0.9	7580	2.6
9	A1	13.6	87.0	28.6	5.3	159	16.8	2.8	46	1.9	285	4.8
10	C3	10.7	85.9	29.7	5.0	123	31.6	18.8	22	1.4	1320	6.6
11	C3	9.4	92.6	33.3	5.1	316	31.9	17.5	20	1.5	415	0.6
12	C3	10.9	88.0	29.6	20.1	559	36.3	6.6	15	0.6	1000	1.4
13	C3	6.1	93.0	30.9	8.4	79	63.9	15.0	46	1.6	840	1.1
14	C3	7.9	89.8	30.7	3.4	512	44.2	25.2	29	0.9	1370	2.7
15	C3	11.0	89.6	30.6	9.2	252	84.4	14.0	44	2.0	340	1.0
16	C3	9.2	84.7	31.2	9.9	133	41.8	11.2	32	1.0	1530	2.1
17	C3	11.7	96.0	32.0	3.1	152	28.7	12.7	47	1.1	1060	1.7
18	C3	11.5	102.0	36.7	10.6	317	17.8	14.0	40	1.9	238	2.1
19	C3	7.9	107.0	36.2	3.6	86	142.0	17.2	2.0	1.1	629	2.3

CDC: Centers for Disease Control classification

Hb: hemoglobin (14.0-18.0 g/dl for men and 12.0-16.0 g/dl for women)*

MCV: mean cell volume (80-96 fl for men and 27-32 fl for women)

MCH: mean cell hemoglobin (27-32 pg)

WBC: white blood cell count (4.0-10.0 x 10⁹/l)

PLT: platelet count (150.0-350.0 x 10⁹/l)

RTC: reticulocyte count (27.0-135.0 x 10⁹/l)

MFI: mean fluorescence index (6.4-25.5%)

SI: serum iron (53-167 μ g/dl for men and 49-151 μ g/dl for women)

Tr: transferrin (2.0-3.6 g/l)

SF: serum ferritin (20-280 μ g/l for men and 10-140 μ g/l for women)

sTfR: soluble transferrin receptor (0.83-1.76 mg/l)

* Values in parenthesis correspond to reference limit

Table 3: Parameters related to iron status in HIV patients with ACD and non anemic. Values in median and range.

PARAMETERS	ACD (n= 10)	Non anemic (n= 42)	P value
SI (µg/dl)	40.0 (2.0-50.0)	146.5 (22.0-380.0)	< 0.0001
Tr (g/l)	1.2 (0.5-2.9)	2.3 (0.7-4.9)	0.0002
SF (ng/ml)	1000.0 (49.7-7580.0)	102.0 (11.3-1280.0)	< 0.0001
sTfR (mg/l)	1.7 (0.6-6.6)	1.5 (0.3-3.2)	0.4976

SI: serum iron; Tr: transferrin; SF: serum ferritin; STfR: soluble transferrin receptor

Table 4: Parameters related to erythropoiesis and activity of disease in HIV patients with ACD and non anemic. Values in median and range.

PARAMETERS	ACD (n=19)	Non anemic (n=42)	P value
Hb (g/dl)	9.43(6.1-13.6)	14.5 (12.3-17.9)	< 0.0001
IFN γ (pg/ml)	98.8 (18.0-246.5)	111.7 (18.9-211.2)	0.8609
EPO (mU/ml)	23.1 (3.2-133.5)	13.3 (2.9-122.0)	0.1070
CD4/CD8	0.13 (0.01-3.30)	0.47 (0.06-1.56)	0.0057
PLT ($\times 10^9/l$)	157.0 (10.8-555.9)	175.0 (31.0-416.0)	0.9565
MFI (%)	14.0 (2.8-25.2)	10.1 (4.2-24.0)	0.0259
RTC ($\times 10^9/l$)	34.0 (15.6-142.3)	39.86 (12.8-109.2)	0.3874

Hb: hemoglobin; IFN γ : interferon γ (reference limit= < 5.5 pg/ml); EPO: erythropoietin (reference limit= 2.6-34 mU/ml); PLT: platelet; MFI: mean fluorescence index; RTC: reticulocyte

Table 5: Spearman correlation coefficient and *P* value in HIV patients with ACD non anemic HIV patients

Variables	ACD	Non anemic
CD4/CD8 x PLT	<i>r</i> = 0.1247 <i>P</i> = 0.6108	<i>r</i> = 0.5075 <i>P</i>= 0.0006
IFN γ x sTfR	<i>r</i> = -0.0790 <i>P</i> = 0.7476	<i>r</i> = -0.0211 <i>P</i> = 0.9317
IFN γ x CD4/CD8	<i>r</i> = -0.8054 <i>P</i>= <0.0001	<i>r</i> = -0.6470 <i>P</i>= 0.0027
IFN γ x RTC	<i>r</i> = -0.3122 <i>P</i> =0.1930	<i>r</i> = -0.4609 <i>P</i> = 0.0470
IFN γ x Hb	<i>r</i> = 0.1930 <i>P</i> = 0.4284	<i>r</i> = 0.0703 <i>P</i> =0.7749
IFN γ x SF	<i>r</i> = 0.1280 <i>P</i> = 0.6013	<i>r</i> = 0.0456 <i>P</i> = 0.8528
IFN γ x SI	<i>r</i> =-0.1721 <i>P</i> = 0.4810	<i>r</i> = -0.5578 <i>P</i>= 0.0131
EPO x Hb	<i>r</i> = -0.06353 <i>P</i>= 0.0035	<i>r</i> = -0.1474 <i>P</i> = 0.3513
sTfR x SI	<i>r</i> = -0.4430 <i>P</i> = 0.0575	<i>r</i> = 0.0898 <i>P</i> = 0.5715

PLT: platelet; IFN γ : interferon γ ; sTfR: soluble transferrin receptor;
 RTC: reticulocyte; Hb: hemoglobin; SF: serum ferritin; SI: serum iron;
 EPO: erythropoietin.