

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA
SAÚDE

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Avaliação da Genotoxicidade Espermática em Pacientes
HIV/AIDS Usuários de Terapia Antirretroviral de Alta Potência

Viviane Raquel Buffon

Caxias do Sul

2015

Viviane Raquel Buffon

Avaliação da Genotoxicidade Espermática em Pacientes HIV/AIDS
Usuários de Terapia Antirretroviral de Alta Potência

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em
Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à
obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Fabio Firmbach Pasqualotto

Co-Orientador: Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques

Caxias do Sul

2015

Viviane Raquel Buffon

B929a Buffon, Viviane Raquel

Avaliação da genotoxicidade espermática em pacientes HIV/AIDS
usuários de terapia antirretroviral de alta potência / Viviane Raquel
Buffon. – 2015.

97 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia, 2015.

Orientação: Fábio Firmbach Pasqualotto.

Coorientação: João Antonio Pêgas Henriques.

1. AIDS. 2. HIV. 3. Espermatozoides. 4. Teste cometa alcalino. I.
Pasqualotto, Fábio Firmbach, orient. II. Henriques, João Antonio Pêgas,
coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UCS com os dados
fornecidos pelo(a) autor(a).

Avaliação da Genotoxicidade Espermática em Pacientes HIV/AIDS Usuários de
Terapia Antirretroviral de Alta Potência

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em
Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à
obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Fabio Firmbach Pasqualotto
Co-Orientador: Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques

DISSERTAÇÃO APROVADA EM QUINZE DE DEZEMBRO DE DOIS MIL E QUINZE.

Prof. Dr. Fabio Firmbach Pasqualotto

Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques

Prof^a Dra. Juliana da Silva

Prof^a Dra. Lessandra Michelim Rodriguez N. Vieira

Prof^a Dra. Eleonora Bedin Pasqualotto

DEDICATÓRIA

À MINHA FAMÍLIA, AOS MEUS AMIGOS, AOS MEUS ALUNOS E AOS MEUS PACIENTES,
QUE COMPREENDERAM A MINHA AUSÊNCIA E ME APOIARAM NESSA CONQUISTA QUE
TEVE UM CAMINHO MAIS LEVE PELAS MÃOS SOLIDÁRIAS E CARINHOSAS QUE ME
ACOLHERAM NOS MOMENTOS DE FRAQUEZA.

AGRADECIMENTO

Ao meu orientador Prof. Dr. Fabio Firmbach Pasqualotto e co-orientador Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques, pelo incentivo, confiança e paciência.

À minha banca de acompanhamento, Prof. Dr. Renato Luis Rombaldi e Prof^a Dra. Eleonora Bedin Pasqualotto, pelo carinho e dedicação.

Aos meus colaboradores incansáveis, Me.Cristiano Trindade, Biol, André Juchem e Dra. Miriana da Silva Machado, pela amizade e tempo dedicado a mim.

À Dra. Rosa Dea Sperhackle, representando o Laboratório de HIV/AIDS da Universidade de Caxias do Sul, pela sua gentileza e generosidade.

Ao Ambulatório de Infectologia do Município de Caxias do Sul e ao Ambulatório Central da Universidade de Caxias do Sul, por aceitar e apoiar as minhas decisões.

Ao Dr. Aldo José Pinheiro Dillon, representando o Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, pelo seu senso de justiça e profissionalismo.

Às minhas confidentes, Prof^a Dra. Lessandra Michelim Rodriguez N. Vieira e Md. Bruna Menezes, por me inspirarem e trabalharem comigo nesse desafio.

À CAPES, FAPERGS e CNPQ, por serem fonte de crescimento científico.

E, por fim, ao meu marido, Carlos Augusto Damin, representando a família que construímos, por me amar incondicionalmente.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1 BREVE HISTÓRICO	22
2.2 AGENTE ETIOLÓGICO	23
2.3 MORFOLOGIA DO RETROVÍRUS	24
2.4 CICLO DE REPLICAÇÃO VIRAL	26
2.5 TRATAMENTO COM TERAPIA ANTIRRETROVIRAL DE ALTA POTÊNCIA	28
2.5.1 CLASSES DE ANTIRRETROVIRAIS	28
2.6 GENOTOXICIDADE, ESTRESSE OXIDATIVO E A PERPETUAÇÃO DOS DANOS AO DNA	32
2.7 AS INTERAÇÕES ENTRE O HIV, INTRS E O DANO MITOCONDRIAL NA INFERTILIDADE HUMANA	34
2.8 INFERTILIDADE MASCULINA E HIV/AIDS	35
2.9 AVALIAÇÃO DA FERTILIDADE MASCULINA	38
2.9.1 ESPERMOGRAMA	38
2.9.2 ESPERMOGRAMA E HIV	39
2.9.3 ENSAIO COMETA E INFERTILIDADE MASCULINA	41
2.9.4 RELAÇÃO COM INFERTILIDADE MASCULINA	43
3. MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1 AMOSTRA	45
3.2 COLETA DA AMOSTRA	45
3.3 ANÁLISE SEMINAL	45
3.3.1 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DO SÊMEN	46
3.3.2 VOLUME	47

3.3.3 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA DAS CARACTERÍSTICAS DO SÊMEN	47
3.3.3.1 AGREGAÇÃO DE AGLUTINAÇÃO	47
3.3.3.2 MOTILIDADE ESPERMÁTICA	47
3.3.3.3. CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA	48
3.3.3.4 CONCENTRAÇÕES DE CÉLULAS REDONDAS E LEUCÓCITOS	49
3.3.4 ENSAIO COMETA ALCALINO	49
3.3.5 CONTAGEM DE LINFÓCIOS T CD4+ E CARGA VIRAL SÉRICA	52
4. RESULTADOS	54
4.1 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	62
5. DISCUSSÃO	71
6. CONCLUSÃO	78
7. BIBLIOGRAFIA	79
8. ANÉXOS	87
8.1. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	87
8.2. CEP	90
8.3. PARECER DO CONSELHO CIENTÍFICO E EDITORIAL	91
8.4. TERMO E CONCORDÂNCIA	92
8.5. PARECER SOBRE SOLICITAÇÃO DE PROJETO DE PESQUISA	93
8.6. QUESTIONÁRIO	94
8.7. PARECER SUBSTANCIADO DO CEP	95

LISTA DE FIGURAS

Figura	Nome	Página
Figura 1	Estrutura morfológica do HIV	25
Figura 2	Ciclo de Replicação do HIV	26
Figura 3	Etapas da replicação viral	27
Figura 4	Classes de danos pelo ensaio cometa alcalino	51
Figura 5	Distribuição dos participantes em grupos de HAART	54
Figura 6	Distribuição da amostra pelo nível de escolaridade	56
Figura 7	Índice de Dano	58
Figura 8	Frequência de Dano	58
Figura 9	Frequência de Dano com uso de HAART e hábitos de vida	59
Figura 10	Índice de Dano associado a dias de uso de HAART por grupos	59
Figura 11	Frequência de Dano associado a dias de uso de HAART por grupos	60
Figura 12	Índice de Dano em usuários de HAART e naive	60
Figura 13	Frequência de Dano em usuários de HAART e naive	61
Figura 14	Frequência de Dano conforme faixas de carga viral	61
Figura 15	Índice de Dano conforme faixas de carga viral	62
Figura 16	Índice de dano x TARV	63
Figura 17	Frequência de dano x TARV	64
Figura 18	Frequência de dano associado à carga viral	65
Figura 19	Índice de dano associado à carga viral	65
Figura 20	Índice de dano x N° em dias de uso HAART	66

Figura 21	Frequência de danos por classes em usuários de HAART	66
Figura 22	Frequência de danos por classes em não usuários de HAART	67
Figura 23	Frequência de danos por classes em usuários de NtRTIs e NNRTIs	67
Figura 24	Frequência de danos por classes em usuários de NtRTIs, NNRTIs e PIs	68
Figura 25	Frequência de danos por classes em usuários de outras combinações	68
Figura 26	Frequências de danos por classes de danos e uso ou não de TARV	69
Figura 27	Índice de dano entre diferentes estudos em espermatozóides	74

TABELA

Tabela	Título	Página
Tabela 1	Parâmetros seminais conforme ano de atualização pela OMS	39
Tabela 2	Dados totais dos pacientes participantes da pesquisa	55
Tabela 3	Dados totais dos pacientes quanto à comorbidade, atividade física e ingestão de café.	57

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
RNA	Ácido ribonucleico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
mtDNA	DNA mitocondrial
Unaid	Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS
Siscel	Sistema de Controle de Exames Laboratoriais
Siclom	Sistema de Controle Logístico de Medicamentos
SAE	Serviços de Assistência Especializada
Sinan	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
<i>Naive</i>	Virgem de tratamento
AZT	Zidovudina
NRTIs	Inibidores nucleosídeos da transcriptase reversa
RT	Transcriptase reversa
NtRTIs	Inibidores nucleotídeos da transcriptase reversa
NNRTIs	Inibidores não-nucleosídeos da transcriptase reversa
PIs	Inibidores da protease
FI	Inibidores de fusão
CRIs	Inibidores para os co-receptores
ITs	Inibidores da integrase viral
HAART	Terapia antirretroviral de alta potência
TARV	Terapia antirretroviral
Cemicamp	Centro de Reprodução Humana da Unicamp

PNPMO	Plano Nacional de Políticas para as Mulheres
SUS	Sistema Único de Saúde
LAV	Vírus associado à Linfadenopatia
HTLV-III	Retrovírus Linfotrópico -T Humano
ELISA	Técnicas de imunoensaio enzimático
SIV	Vírus da imunodeficiência símia
Nm	Nanômetros
ddI	Didanosina
3TC	Lamivudina
d4T	Estavudina
ddC	Zalcitabina
ABC	Abacavir
FTC	Emtricitabina
Pb	Pares de bases
ddN	2', 3'-dideoxynucleosídeos
LPO	Peroxidação lipídica
GSH	Glutathiona forma reduzida
GSSH	Glutathiona forma oxidada
EO	Estresse oxidativo
MDA	Malondialdeído
OXPPOS	Fosforilação oxidativa
PDE5	Enzima fosfodiesterase tipo 5
FIV	Fertilização em vitro
ICSI	Injeção intracitoplasmática de espermatozóides

OMS	Organização Mundial da Saúde
MGT	Trato genital masculino
ARVs	Antirretrovirais
EC	Ensaio cometa
NN	Não nucleotídeos
dH2O	Água destilada

RESUMO

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) é doença causada pelo vírus da imunodeficiência humana. Apesar dos benefícios proporcionados pela terapia de supressão viral, algumas doenças como lipodistrofia, doenças cardiovasculares e infertilidade aumentaram a sua prevalência. No paciente com AIDS, considera-se a carga viral e o uso de terapia antirretroviral como possíveis agentes de genotoxicidade. Apesar do espermograma não poder detectar a causa precisa da infertilidade, o mesmo ainda é o exame mais realizado para averiguar a qualidade seminal. Por outro lado, a integridade do DNA do espermatozóide tem sido proposta como um parâmetro adicional de qualidade do sêmen. O ensaio cometa alcalino detecta a genotoxicidade de células germinativas humanas e pode ser usado para demonstrar a capacidade de uma substância interagir com o material genético das células gonadais. O presente estudo incluiu 50 pacientes com AIDS, atendidos no Ambulatório de Infectologia do Município de Caxias do Sul e no Ambulatório da Universidade de Caxias do Sul, sendo analisados dois grupos: usuário de terapia antirretroviral e *naive*. Realizou-se espermograma e o ensaio cometa alcalino, comparando com o número de linfócitos T CD4+, a carga viral, a idade, etc. Os dados demonstraram que o uso de antirretrovirais reduziu a genotoxicidade espermática, mas não se encontrou correlação com o espermograma. O presente trabalho demonstra que o ensaio cometa alcalino é um método eficiente para mensurar a genotoxicidade espermática dos pacientes portadores do vírus da imunodeficiência adquirida.

PALAVRAS-CHAVE: AIDS, HIV, espermatozóides, teste cometa alcalino.

ABSTRACT

The Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) is a disease caused by the human immunodeficiency virus. Despite all the benefits provided by the viral suppression therapy, some diseases such as lipodystrophy, heart diseases and infertility increased their prevalence. In patients with AIDS, viral load and anti-retroviral therapy are possible agents for genotoxicity. The World Health Organization guidelines are reference for semen analysis and sperm DNA integrity has been proposed as an additional parameter for semen quality and a potential predictor of fertility. The alkaline comet assay has the potential to detect genotoxic human germ cells and can be used to demonstrate the ability of a substance or metabolite to interact directly with the genetic material of gonadal cells. The study has included 50 patients with AIDS treated at the Outpatient Center for Infectious Diseases and at the University of Caxias do Sul Clinical Center, evaluated as two groups: one treated with anti-retroviral therapy and the other was a naive group. Semen and sperm genotoxicity were analysed by alkaline comet assay, comparing CD4 cell count, viral load, age and other factors of potential genotoxicity between the two groups. Data showed that the use of any anti-retroviral class has reduced sperm genotoxicity. This study shows that the alkaline comet assay is a efficient method to measure sperm genotoxicity in patients infected with the human immunodeficiency virus.

Keywords: AIDS, HIV, sperm DNA damage, alkaline comet assay.

1.INTRODUÇÃO

A AIDS é uma doença desencadeada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), que é um retrovírus com genoma de RNA pertencente à família *Lentiviridae*. A multiplicação viral é dependente de linfócitos TCD4, provocando sua redução gradual e favorecendo o desenvolvimento de diversas infecções (Guimarães *et al.* 2013)

Dados provenientes da Unaid estimam que existam mais de 36 milhões de pessoas vivendo com o HIV em todo o mundo, e contabilizam-se mais de 16 milhões de óbitos. Na região da América Latina e Caribe, estima-se haver aproximadamente 1,4 milhões de pessoas infectadas pelo HIV, e na região que compreende os estados-parte do MERCOSUL concentram-se de 650 a 700 mil pessoas infectadas entre os 15 e 49 anos (MERCOSUL 2012).

No Brasil, a infecção pelo HIV continua sendo de grande relevância para a saúde pública. Segundo os dados registrados no Sistema de Controle de Exames Laboratoriais (Siscel) e no Sistema de Controle Logístico de Medicamentos (Siclom) do país, em 2012, cerca de 50 mil pessoas vivendo com HIV foram atendidas pela primeira vez na rede pública de Serviços de Assistência Especializada (SAE) e cerca de 310 mil receberam medicamentos antirretrovirais pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (Pereira 2014; BRASIL 2013). Desde o início da epidemia de AIDS no Brasil até junho de 2014, foram registrados no país 757.042 casos de AIDS, sendo 593.217 (78,4%) notificados no Sinan, 42.006 (5,5%) e 121.819 (16,1%) no Siscel/Siclom. A distribuição proporcional dos casos de AIDS no Brasil segundo região mostra uma concentração dos casos nas regiões Sudeste e Sul, correspondendo a 54,4% e 20,0% do total de casos identificados de 1980 até junho de 2014 (Brasil 2014).

A principal característica dessa infecção é a imunossupressão progressiva, que predispõe o indivíduo ao desenvolvimento de doenças oportunistas que, se não tratadas, o levam ao óbito (Deresz *et al.* 2007). Com o intuito de minimizar esse desfecho, 26 antirretrovirais estão disponíveis para o controle da infecção pelo HIV. A disponibilidade dessas drogas levou a redução da mortalidade a partir do final da década de 90 nos Estados Unidos e Europa. Posteriormente, a redução dos custos na terapia antirretroviral, a sua formulação genérica e o aumento da ajuda internacional por meio de financiamentos, aumentou a disponibilidade dos antirretrovirais a uma maior parte da população mundial. No Brasil, desde 1996, a partir da publicação da Lei 9.313/96, o Ministério da Saúde garante o tratamento com antirretroviral a todas as pessoas com HIV/AIDS. No mundo, a maior disponibilidade de acesso aos antirretrovirais resultou no aumento de 200.000 pessoas em tratamento em 2001 para 8 milhões em 2011 em países de baixa e média renda, proporcionando aumento da expectativa de vida. Além disso, a semelhança da expectativa de vida com pessoas não portadoras de HIV estimulou o início cada vez mais precoce da terapia antirretroviral (Piot and Quinn 2013).

Apenas dois anos após a identificação da AIDS, pesquisadores empenharam-se para desenvolver fármacos que reduzissem a infectividade e replicação viral. O primeiro composto que demonstrou ser capaz de inibir a replicação do HIV tanto *in vitro* quanto *in vivo* foi a suramina. No entanto, o primeiro agente antiviral licenciado para uso clínico foi a Zidovudina (AZT) em 1987. Existem atualmente sete classes de antirretrovirais: os inibidores nucleosídeos da transcriptase reversa (NRTIs), os inibidores nucleotídeos da transcriptase reversa (NtRTIs), os inibidores não-nucleosídeos da transcriptase reversa (NNRTIs), os inibidores da protease (PIs), os inibidores da entrada viral na célula ou

inibidores de fusão (FIs), os inibidores para os co-receptores (CRIs) e os inibidores da integrase viral (ITs) (Guimarães 2013).

A terapia antirretroviral de alta potência propiciou redução da mortalidade quando relacionada, essencialmente, com a queda significativa das doenças oportunistas e neoplásicas. Esse fato pode ser observado devido a políticas de saúde pública que, no Brasil, por exemplo, viabilizaramo fácil acesso aos antirretrovirais por todas as classes sociais (Mesquita *et al.* 2013; Veras *et al.* 2011; Cordeiro *et al.* 2010).

Apesar de todos os benefícios proporcionados pela terapia de supressão viral, um número crescente de co-morbidades relacionadas ao uso de terapia antirretroviral de alta potência (HAART) e a própria infecção viral foram pontuadas, dentre elas, a lipodistrofia, as doenças cardiovasculares e a infertilidade (Ethics Committee 2015; Costa & Almeida 2015). Dez anos depois da introdução da HAART, a síndrome de lipodistrofia, por exemplo, é gradualmente entendida como o resultado da sobreposição e efeitos distintos dos diferentes componentes das drogas antirretrovirais (Kushnir & Lewis 2011).

Os NRTIs são pró-drogas, uma vez que, antes de serem capazes de inibir o seu alvo, são ativados dentro das células através da fosforilação. Em adição à inutilização da maquinaria replicativa do HIV, os NRTI-trifosfatos também inibem a polimerase humana designada "gama-polimerase", que é responsável pela replicação do DNA mitocondrial (mtDNA). Assim, a inibição da gama-polimerase pelos NRTIs conduz ao declínio do mtDNA, que é uma pequena molécula circular presente em cópias múltiplas em cada mitocôndria e em centenas de cópias na maioria das células humanas. A principal atividade biológica do mtDNA é codificar as subunidades das enzimas

envolvidas na cadeia respiratória, que estão localizadas na membrana interna mitocondrial (Kushnir & Lewis 2011; Walker *et al.* 2009; Walker *et al.* 2007).

Existem diferenças significativas na potência dos nucleosídeos e seus análogos na capacidade de interagirem com a “gama-polimerase”. O potencial de inibição da “gama-polimerase” por parte dos metabólitos ativos dos NRTIs ocorre da seguinte forma: zalcitabina > didanosina > estavudina > lamivudina > abacavir \geq tenofovir \geq emtricitabine (Guimarães 2013).

Na biologia celular básica, a mitocôndria é determinante central do desenvolvimento adequado de oócitos e a pré-implantação de embriões. Tendo por base a hipótese do *pol* y da inibição da replicação do mtDNA, o potencial reprodutivo de um indivíduo pode ser negativamente afetado pelos NTRIs pelo dano mitocondrial na biogênese dos gametas. Dados existentes apoiam o conceito da redução de mtDNA ser observada em espermatozóides e oócitos de pacientes recebendo NTRIs. Oócitos com baixo mtDNA demonstram ter menor capacidade de fertilização (Guimarães 2013; Kushnir & Lewis 2011).

A fertilidade do gameta masculino também pode estar alterada nestes pacientes com HIV. Parâmetros de espermatozóides que refletem a fertilidade são significativamente prejudicados em homens infectados pelo HIV-1. Medidas como o volume de sêmen, motilidade, concentração e morfologia estão alteradas. Parâmetros seminais correlacionam-se diretamente com a contagem de Linfócitos TCD4+, sugerindo que os pacientes com AIDS são menos férteis do que os pacientes não portadores de HIV. Além disso, homens infectados com esse retrovírus são mais propensos a ter orquite, hipogonadismo e leucospermia que poderiam ser responsáveis

por oligozoospermia e teratozoospermia (Yudin *et al.* 2010; Liao *et al.* 2015; Kushnir & Lewis 2011).

Além do cuidado individual, os antirretrovirais possibilitam uma reavaliação simbólica do processo reprodutivo, antes considerado incompatível com a presença do vírus, frente à possibilidade da sua transmissão ao feto. Em 2001, o Centro de Reprodução Humana da Unicamp (Cemicamp) realizou pela primeira vez na América Latina a fertilização com sêmen purificado de um portador do vírus HIV. Em 2004, foi lançado o Plano Nacional de Políticas para as Mulheres (PNPMO). Em 2005, como um dos resultados desse plano, foi publicada a Portaria 426 que instituiu, no âmbito do SUS, a Política Nacional de Atenção Integral em Reprodução Humana Assistida do Ministério da Saúde, cujas bases programáticas previam a atenção básica, média e de alta complexidade no sistema de saúde a casais com problemas de fertilidade, portadores de doenças infectocontagiosas, como hepatites virais, sífilis e AIDS ou genéticas (Moás *et al.* 2013; Vargas *et al.* 2010)

O reconhecimento do número de infectados pelo HIV no mundo e os benefícios que a HAART trouxe referente ao aumento da sobrevivência e, conseqüentemente, a melhora da qualidade de vida, trouxe uma nova abordagem em relação aos cuidados com as doenças crônicas. Além disso, sabendo que grande parte dos portadores de HIV está em idade fértil, é natural o questionamento sobre a fertilidade desses pacientes, tendo em vista a presença do vírus em órgãos e tecidos assim como a influência da TARV na capacidade reprodutiva. Todas essas condições ainda são pouco estudadas. Portanto, o presente estudo teve como objetivo geral avaliar a genotoxicidade espermática de pacientes com HIV em uso de terapia antirretroviral e sua implicação na infertilidade masculina. Entre os objetivos específicos, foi avaliado, por meio do método

ensaio cometa alcalino, a genotoxicidade espermática induzida pela terapia antirretroviral de alta potência em pacientes adultos com HIV, associando os resultados do índice e frequência de dano dos espermatozóides com o espermograma, nível de Linfócitos TCD4+ com a genotoxicidade espermática, e o nível de carga viral sérica com a genotoxicidade espermática.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Breve histórico

Os primeiros casos de AIDS foram descritos no século XX. Em 1981, nos Estados Unidos da América, foram diagnosticadas doenças oportunistas como *Sarcoma de Kaposi* e pneumonia por *Pneumocystis jiroveci* em jovens previamente saudáveis, na sua maioria, homossexuais. Até o momento, essas doenças somente eram diagnosticadas em pacientes imunodeprimidos por neoplasias malignas. Até o final do ano de 1981, a doença havia sido diagnosticada apenas em homossexuais ou bissexuais masculinos, inferindo-se que a doença tivesse relação com o estilo de vida e doenças sexualmente transmissíveis. Devido a essas considerações, a nova doença ficou conhecida como “peste gay”, trazendo consigo o preconceito da comunidade científica e, mais tarde, da sociedade civil. Entre os anos de 1982 e 1983 identificaram-se casos em hemofílicos, usuários de drogas injetáveis ilícitas, receptores de transfusão sanguínea e crianças de mães portadoras do HIV (Guimarães 2013; Brasil 2013).

Em 1983, o vírus foi isolado na França, no Instituto *Pasteur* de Paris, a partir de linfonodos, sendo chamado de LAV (Vírus associado à Linfadenopatia). Em seguida, no Instituto Nacional do Câncer em *Bethesda* (EUA), recebeu a denominação HTLV-III (Retrovírus Linfotrópico -T Humano) pelo Dr. *Robert Gallo*. Em 1986, quando já se utilizava a denominação unificada de HIV-1 (Vírus da Imunodeficiência Humana 1), descobriu-se na África Ocidental o subtipo HIV-2. Em 2011, identificou-se, também na África, o subtipo 3, que é a fusão dos subtipos 1 e 2 em pessoa que se infectou inicialmente pelos 2 subtipos. Esse novo subtipo apresenta uma capacidade de evolução mais rápida para a AIDS (Deresz *et al* 2010; Piot & Quinn 2013).

O aumento do número de casos de AIDS no mundo, associado à alta taxa de mortalidade, mobilizou a comunidade científica para o desenvolvimento de testes sorológicos para a identificação da infecção pelo HIV. A partir de 1985, disponibilizaram-se os testes por meio da pesquisa de anticorpos pelas técnicas de imunoensaio enzimático (ELISA) e *western blot*, ainda hoje amplamente utilizados. Com a possibilidade de identificação precoce dos portadores de HIV, a história natural da doença pode ser estudada. Além disso, com a identificação da estrutura viral, fármacos puderam ser lançados para minimizar a epidemia e a sua morbimortalidade (Barboza *et al.* 2004; Guimarães 2013).

2.2 Agente etiológico

O HIV é um retrovírus com genoma RNA, da Família *Retroviridae* (retrovírus) e subfamília *Lentiviridae*. Pertence ao grupo dos retrovírus citopáticos e não-oncogênicos que necessitam, para multiplicar-se, de uma enzima denominada transcriptase reversa, responsável pela transcrição do RNA viral para uma cópia DNA, que pode, então, integrar-se ao genoma do hospedeiro (Melo *et al.* 2006; Politch *et al.* 1994).

Embora não se saiba ao certo qual a origem do HIV-1 e 2, sabe-se que uma grande família de retrovírus relacionados a eles está presente em primatas não humanos, na África subsaariana. Todos os membros desta família de retrovírus possuem estrutura genômica semelhante, apresentando homologia em torno de 50%. Além disso, todos têm a capacidade de infectar linfócitos através do receptor CD4+. Aparentemente, o HIV-1 e o HIV-2 passaram a infectar o homem há poucas décadas; alguns trabalhos científicos recentes sugerem que isso tenha ocorrido entre os anos 40 e 50. Numerosos retrovírus de primatas não humanos encontrados na África têm apresentado grande

similaridade com o HIV-1 e com o HIV-2. O vírus da imunodeficiência símia (SIV), que infecta uma subespécie de chimpanzés africanos, é 98% similar ao HIV-1, sugerindo que ambos evoluíram de uma origem comum. Por esses fatos, supõe-se que o HIV tenha origem africana. Ademais, diversos estudos sorológicos realizados na África, utilizando amostras de soro armazenadas desde as décadas de 50 e 60, reforçam essa hipótese (Barros 2007; Gerschenson *et al.* 2000).

O HIV é bastante lábil no meio externo, sendo inativado por uma variedade de agentes físicos (calor) e químicos (hipoclorito de sódio, glutaraldeído). Em condições experimentais controladas, as partículas virais intracelulares parecem sobreviver no meio externo por até, no máximo, um dia, enquanto que partículas virais livres podem sobreviver por 15 dias, à temperatura ambiente, ou até 11 dias, a 37°C (Guimarães 2013; Barros 2007).

Recentemente, têm sido descritas, ainda, variantes genômicas (subtipos), tanto de HIV-1 quanto de HIV-2, em pacientes infectados procedentes de diferentes regiões geográficas. Classificam-se, assim, os isolados de HIV-1 em dois grupos, M (*major*) e O (*outlier*), com variabilidade genética de até 30%. No grupo M, identificam-se nove subtipos (A, B, C, D, E, F, G, H e I), e no grupo O, apenas um. Em relação ao HIV-2 descrevem-se cinco subtipos: A, B, C, D, e E. Embora ainda não conhecida, há a possibilidade de variantes virais possuírem diferentes índices de transmissibilidade e/ou patogenicidade (Vargas *et al.* 2010, Melo *et al.* 2006).

2.3 Morfologia do retrovírus

O HIV é um vírus de aproximadamente 100 nm de diâmetro. As estruturas morfológicas (Fig. 1) dos vírus HIV tipo 1 e 2 incluem proteínas estruturais e funcionais

e um genoma de RNA protegidos pelo envelope viral. O envelope é constituído por uma bicamada lipídica e contém uma proteína complexa, conhecida como *env*. Esta proteína é constituída pelas glicoproteínas gp41, transmembrana e gp120, exposta à camada externa do envelope. Na face interior, o HIV possui a proteína viral denominada p17 (matriz) e, envolvido por esta proteína, está o capsídeo composto pela p24. Na parte mais interna, encontram-se os elementos mais importantes: dois filamentos simples de RNA, a proteína p7 (nucleocapsídeo) e três enzimas essenciais, p51 (transcriptase reversa), p11 (protease) e p31 (integrase) (Melo *et al.* 2006; Feng *et al.* 2001).

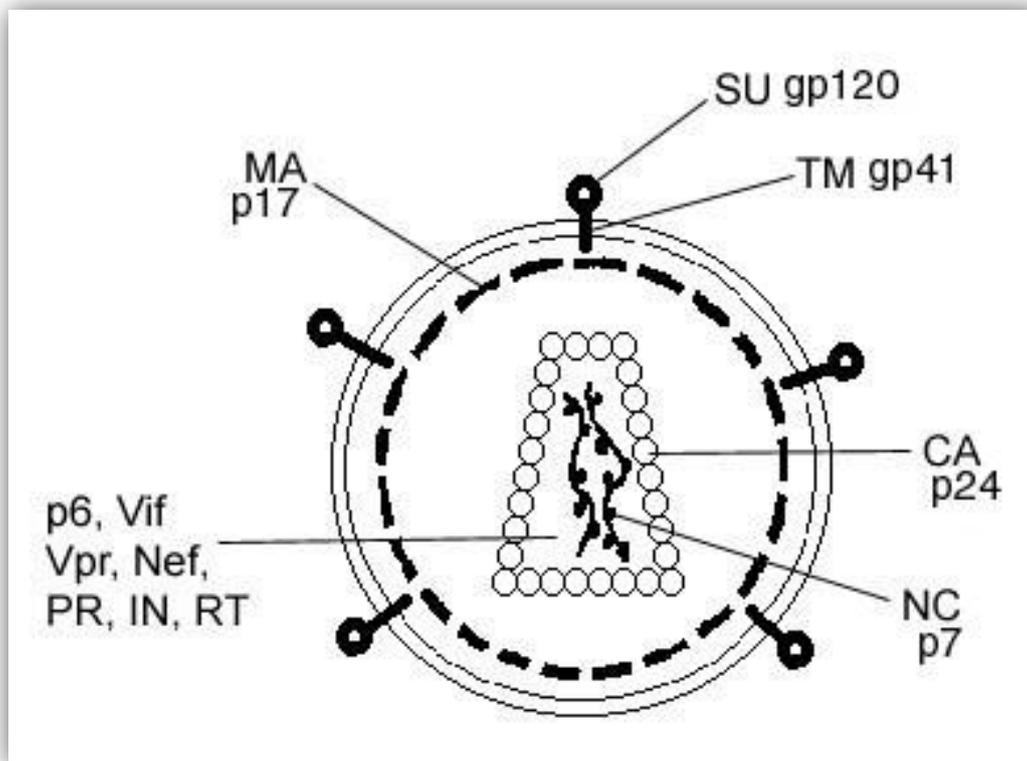


Figura 1. Estrutura morfológica do HIV. Proteínas estruturais e funcionais de um genoma de RNA protegidos pelo envelope viral do vírus da imunodeficiência adquirida. Adaptado de Peçanha *et al.* (2002).

2.4 Ciclo de replicação viral

O ciclo de replicação do HIV (Fig. 2) ocorre no interior do linfócito T e é constituído de várias etapas, cada uma com alvo potencial para desenvolvimento de estratégias terapêuticas contra a AIDS (Melo *et al.* 2006).

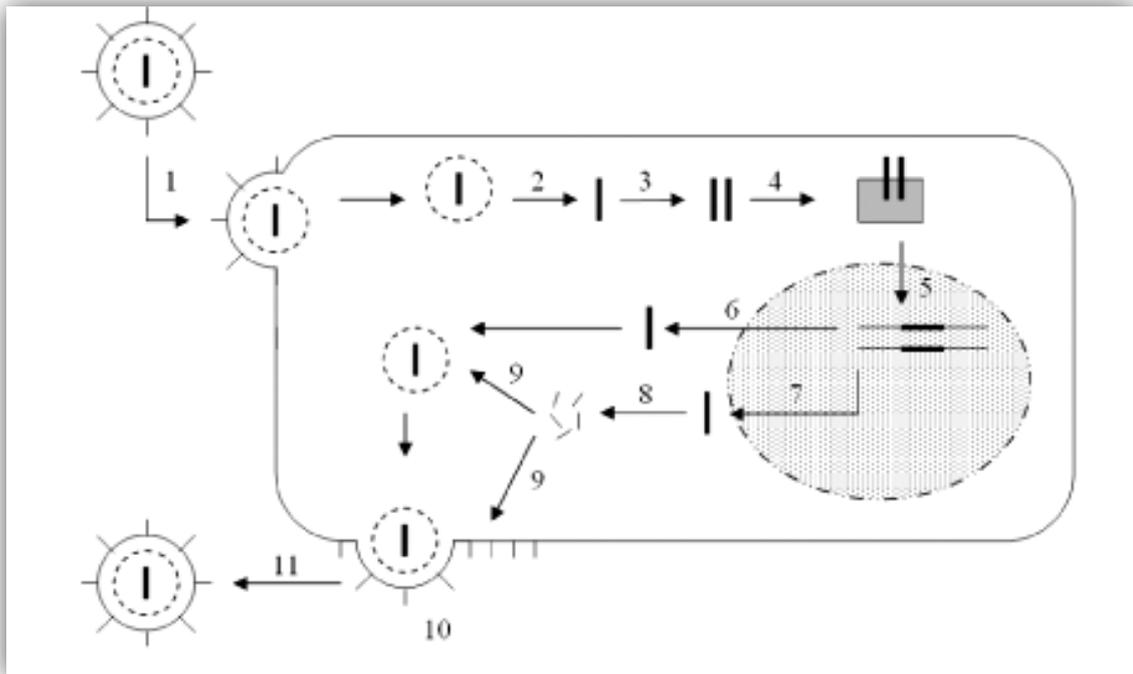


Figura 2. Ciclo de Replicação do HIV. 1. Ligação de glicoproteínas virais (gp120) ao receptor específico da superfície celular (principalmente linfócitos T-CD4); 2. Fusão do envelope do vírus com a membrana da célula hospedeira; 3. Liberação do "core" do vírus para o citoplasma da célula hospedeira; 4. Transcrição do RNA viral em DNA complementar, dependente da enzima transcriptase reversa; 5. Transporte do DNA complementar para o núcleo da célula, onde pode haver integração no genoma celular (provírus), dependente da enzima integrase, ou a permanência em forma circular, isoladamente; 6. O provírus é reativado, e produz RNA mensageiro viral, indo para o citoplasma da célula; 7. Proteínas virais são produzidas e quebradas em subunidades, por intermédio da enzima protease; 8. As proteínas virais produzidas regulam a síntese de novos genomas virais, e formam a estrutura externa de outros vírus que serão liberados pela célula hospedeira; 9. O vírion recém-formado é liberado para o meio circundante da célula hospedeira, podendo permanecer no fluido extracelular, ou infectar novas células. 10. Brotamento. 11. Maturação. Adaptado Melo *et al.* (2006).

O conhecimento do ciclo viral (Fig. 3) permitiu que fossem desenvolvidos antirretrovirais que são divididos em classes: Inibidores Nucleosídeos da Transcriptase Reversa, Não Nucleosídeos da Transcriptase Reversa, Inibidores de Protease, Fusão e Integrase.

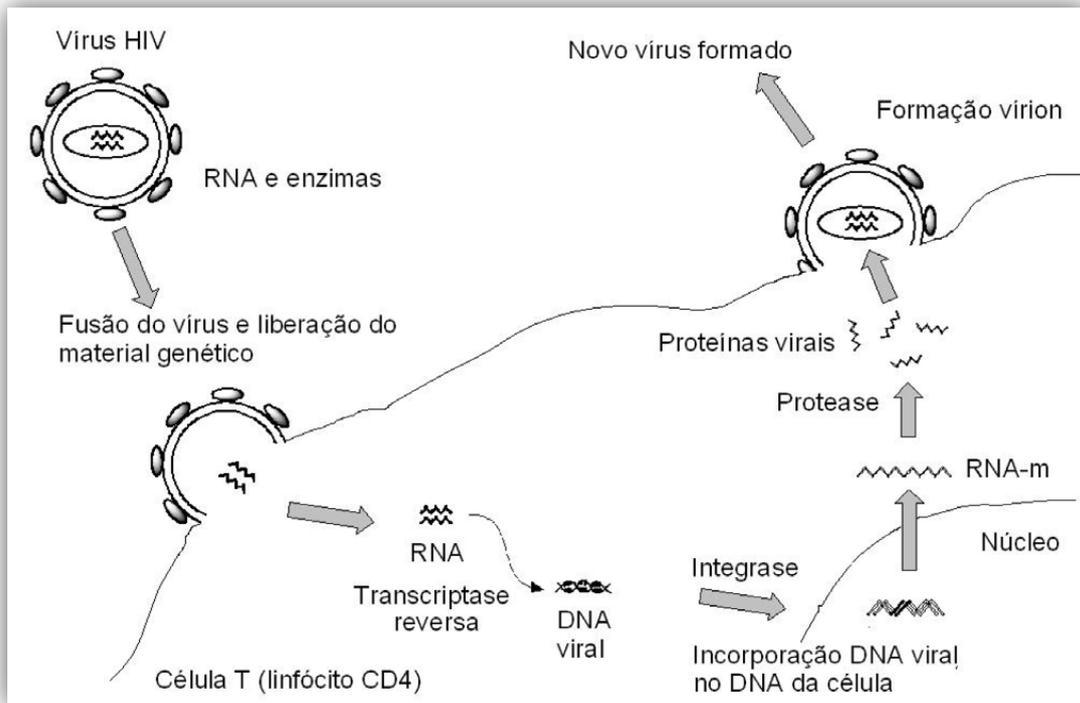


Figura 3. Etapas da replicação viral. 1. Inibidores da transcriptase reversa: atuam na fase inicial do ciclo, impedindo a formação do DNA a partir do RNA; 2. Inibidores da protease: atuam no final do ciclo, impedindo a maturação da partícula viral; 3. Inibidores de fusão: impedem a fusão da membrana viral com a membrana celular, impedindo a entrada do vírus; 4. Inibidores de entrada que impedem a ligação do vírus ao receptor (CD4+) ou os co-receptores (CCR5 ou CXCR4); 5. Inibidores da Integrase: impedem que o provírus recém-produzido pela RT integre o genoma da célula hospedeira. Adaptado Ref. Cunico *et al.* (2008).

2.5 Tratamento com terapia antirretroviral de alta potência

2.5.1 Classes de antirretrovirais

Existem atualmente sete classes de antirretrovirais para o tratamento do HIV: NRTIs, NtRTIs, NNRTIs, PIs, FIs, CRIs e ITs (Kushnir *et al.* 2011; Melo *et al.* 2006; Lewis *et al.* 2001; Kakuda 2000).

O vírus HIV infecta, principalmente, as células que contêm a molécula CD4+ em sua superfície. Para penetrar nas células, o HIV une-se ao receptor da CD4+ pela glicoproteína gp120 que é encontrada em sua superfície. Uma vez unido à CD4+, o HIV ativa outras proteínas na superfície da célula humana, conhecidas como co-receptores CCR5 e CXCR4, completando assim a fusão. Os antirretrovirais inibidores de fusão agem nesse estágio do ciclo de vida do HIV. O composto T-20 (enfuvirtide, Fuzeon®) é um polipeptídeo constituído de 36 aminoácidos que interage com a gp41 impedindo a fusão do vírus com a membrana da célula. Uma vez ocorrida a fusão, a parte interior do vírus, composta pelo RNA e algumas enzimas importantes, é absorvida pela célula humana. Em seguida, a enzima viral denominada transcriptase reversa recodifica o material genético do HIV, convertendo-o de RNA para DNA. Três classes de medicamentos anti-HIV atacam o vírus nesse estágio: os análogos de nucleosídeos (AZT/zidovudina, ddI/didanosina, 3TC/lamivudina, d4T/estavudina, ddC/zalcitabina, ABC/abacavir e FTC/emtricitabina); os análogos de nucleotídeo (tenofovir, adefovir) e, os inibidores não-nucleosídeos da transcriptase reversa (efavirenz, nevirapina, delavirdina) (Cunico *et al.* 2008; Ulrich *et al.* 2007).

Os NRTIs interagem com o sítio catalítico da RT, enquanto os NNRTIs interagem com um sítio alostérico localizado a uma curta distância do sítio catalítico

(+/- 10.000 pb). Para que possam interagir com os sítios de ligação para os substratos, os NRTIs e os NtRTIs necessitam ser fosforilados em suas formas trifosfato e difosfato (Lewis *et al.* 2001).

Os NRTIs atuam na atividade da RT, mediante sua incorporação na cadeia de DNA, levando à interrupção da transcrição de RNA para DNA. Neste grupo estão incluídos diversos medicamentos utilizados em paciente com AIDS, entre eles: Zidovudina (AZT), Lamivudina (3TC), Didanosina (ddI), estavudina (d4T), zalcitabina (ddC), abacavir (ABC), emtricitabina (FTC) e Tenofovir (TDF) (Kohler & Lewis 2007; Kakuda 2000).

Todos os NRTIs podem ser considerados análogos 2', 3'-dideoxynucleosídeos (ddN) e agem de forma semelhante. Após a entrada do fármaco nas células, as moléculas são fosforiladas em sua forma 5'-monofosfato, 5'-difosfato e 5'-trifosfato, seguindo o mesmo mecanismo de fosforilação (ddN -> ddNMP -> ddNDP -> ddNTP), sendo que a sua forma trifosfatada irá agir como inibidor competitivo ou substrato alternativo da RT em lugar do desoxynucleosídeo trifosfato endógeno (dNTP), como o dATP, dTTP, dGTP ou dCTP (Guimarães. 2013). Especificamente, o AZT e o d4T são convertidos em competidores do dTTP. O ddC, 3TC e o FTC são convertidos em competidores do dCTP. Já o ddI compete com o dATP e o ABC com o dGTP (Barros 2007).

Tanto atuando como inibidores competitivos quanto como substratos alternativos (ddNMP), que podem ser incorporados na construção do genoma viral, os NRTIs inibem a incorporação do substrato normal (dNTPs) durante a formação da cadeia de DNA e ligam-se estavelmente a RT. Desse modo, a enzima fica acoplada à

cadeia em construção, sendo esta a causa de agirem como terminadores de cadeia (Barros 2007).

Por outro lado, os NtRTIs podem ser claramente diferenciados dos NRTIs por serem análogos nucleotídeos (e não nucleosídeos) e por precisarem passar por apenas duas etapas de fosforilação para serem convertidos em suas formas ativas, enquanto que os NRTIs necessitam de três etapas para serem ativados (Guimarães 2013; Kakuda 2000).

As proteases retrovirais pertencem à família das proteases aspárticas, que apresentam resíduos deste aminoácido em uma região altamente conservada do sítio catalítico. As proteases aspárticas retrovirais possuem menos do que 130 resíduos de aminoácido, e apresentam pouca homologia com as proteases não virais ou mesmo com outras proteases virais (Peçanha *et al.* 2002). A enzima viral chamada protease é responsável pelo processamento das poliproteínas *gag* e *gag-pol*, levando à formação das proteínas estruturais e funcionais responsáveis pela formação da estrutura de uma nova partícula do vírus. A protease do HIV pertence à família das aspartil proteases, ou seja, possuem dois grupos β -carboxi aspartil no sítio ativo. Estes grupos (Asp 25 e Asp 25') são responsáveis por catalisar a hidrólise das ligações peptídicas. Conforme o mecanismo, um resíduo aspartil auxilia na adição de uma molécula de água à carbonila da amida do substrato, formando um intermediário tetraédrico que possui grande afinidade pelo sítio catalítico. Após a formação deste intermediário, ocorre a quebra da ligação C-N com a formação de um ácido carboxílico e de uma amina primária. Substâncias químicas que mimetizam este intermediário tetraédrico impedem a hidrólise do substrato e, conseqüentemente, o ciclo do vírus HIV é interrompido (Lv *et al.* 2015). Os inibidores da protease do HIV interferem no último estágio da replicação viral,

prevenindo a formação de novos vírus. São eles: saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir, amprenavir, fosamprenavir, lopinavir e atazanavir. A enzima integrase do HIV é essencial para a replicação viral, sendo responsável por inserir o DNA pró-viral no cromossomo do hospedeiro e por catalisar a incorporação deste DNA pró-viral ao genoma da célula infectada (Cunico et al. 2008). A enzima integrase possui 288 aminoácidos codificados pelo gene pol do HIV-1, sendo composta por três domínios funcionais: N-terminal, catalítico e C-terminal (Craigie 2011). A atuação da integrase pode ser dividida em três etapas: processamento do DNA viral por clivagem do nucleotídeo do terminal-3', formação do complexo de pré-integração e transferência de cadeia, quando o DNA viral é inserido no DNA da célula do hospedeiro. As principais diferenças dessa classe em relação às outras são: (1) atuação num alvo novo, a integrase, que inibe a etapa de transferência de cadeia do DNA viral para o DNA do hospedeiro, deslocando o DNA viral do sítio ativo; (2) atividade contra cepas de HIV-1 resistentes aos inibidores da transcriptase reversa e da protease; (3) as células de mamíferos não apresentam enzimas integrase, o que torna essa classe altamente específica contra o vírus e, portanto, de baixa toxicidade. Destaca-se nesse grupo o Raltegravir (Blanco *et al.* 2012).

As proteases pertencem à família das proteases aspárticas, que apresentam resíduos deste amino ácido em uma região altamente conservada do sítio catalítico. As proteases aspárticas retrovirais possuem menos do que 130 resíduos de amino ácido, e apresentam pouca homologia com as proteases não virais ou mesmo com outras proteases virais (Peçanha *et al.* 2002).

O principal objetivo da terapia antirretroviral é suprimir de modo duradouro a replicação viral, para atingir o máximo de redução da carga viral plasmática, associado,

se possível, com uma boa resposta clínica e imunológica. Entretanto, o uso prolongado dos medicamentos pode gerar uma série de transtornos clínicos, que colocam em risco a persistência dos pacientes no tratamento e também induzir mutações que conferem ao HIV-1 grande resistência aos fármacos (Brasil 2013).

Alta taxa de mutação do HIV pode gerar uma sequência de heterogeneidade na doença, com consequências não esperadas sobre a eficácia das terapias. A grande maioria das mutações descritas, associadas à resistência viral, está agrupada em torno do sítio de ligação da RT, para um dado inibidor. Mutações na região C-terminal da RT, por exemplo, associadas ao tratamento antirretroviral, podem induzir a suscetibilidade do vírus aos NRTIs e NNRTIs (Melo *et al.* 2006; Feng *et al.* 2001).

Com a finalidade de minimizar resistência e falhas na terapia, desde 1990, orienta-se o uso de terapia tripla para a supressão viral contínua. Preconiza-se o seguinte esquema: 2 NRTIs/1NNRTI. Esse esquema é de fácil posologia e, portanto, melhora a adesão ao tratamento (Brasil 2012).

2.6 Genotoxicidade, estresse oxidativo e a perpetuação dos danos ao DNA

O DNA é um polímero de apenas quatro subunidades, sendo encontrado em todos os seres vivos. A espécie humana expõe-se a uma infinidade de compostos genotóxicos pela ingestão de alimentos, medicamentos, bebidas, pela inalação de fumaças e radiações presentes no meio ambiente. A exposição a agentes genotóxicos ambientais pode causar uma variedade de efeitos sobre a saúde humana. Alguns destes efeitos expressam-se imediatamente, enquanto outros podem levar anos para se manifestar (Lewis *et al.* 2001).

Além dos agentes ambientais que podem ser chamados de extrínsecos, existem também os erros intrínsecos à molécula de DNA. Nenhuma molécula é absolutamente estável e o DNA, para exercer sua função de referência dos processos de manutenção da vida, precisa interagir com outras moléculas, principalmente com proteínas, para ser copiado e duplicado (Barros 2007).

A infecção pelo HIV produz estresse oxidativo e, secundariamente, dano celular de gravidade variada e sua regressão é dependente do balanço redox entre oxidantes e antioxidantes. Os indivíduos HIV positivos apresentam distúrbios no metabolismo da glutathione, concentrações de antioxidantes séricos e teciduais diminuídos, produtos da peroxidação lipídica LPO aumentados e as células T CD4+ caracterizadas por diminuição dos níveis de glutathione na forma reduzida (GSH), aumento da glutathione na forma oxidada (GSSG que, conseqüentemente, gera a diminuição da razão GSH/GSSG), indicando estresse oxidativo (EO). O EO tem atuação patogênica dominante na infecção pelo HIV. Como os níveis de GSH e cisteína estão significativamente reduzidos no plasma e nos leucócitos, os indivíduos HIV positivos têm aumento na LPO com ondulações nos altos níveis plasmáticos de malondialdeído MDA, vitamina C, glutathione peroxidase, selênio e superóxido dismutase. Apesar da significativa melhoria nos parâmetros clínicos, virais e imunológicos dos indivíduos HIV positivos que utilizam HAART, alguns medicamentos que a compõem podem aumentar o EO. Entre eles, está o Efavirenz e a Zidovudina (Deresz *et al.* 2010; Hulgan *et al.* 2003).

As células T CD4+ dos indivíduos HIV positivos são caracterizadas por apresentar baixa capacidade antioxidante. Antes do início do tratamento com a TARV, eles apresentam significativas diminuições nos níveis plasmáticos de vitamina C. A

TARV induz aumento dos marcadores dessa vitamina antioxidante, os maiores níveis ocorrendo após o tratamento; porém, os valores não atingem a normalidade. Ademais, durante o tratamento com a TARV foram encontradas diminuições nos níveis do MDA, mas, como observado para a vitamina C, não chegaram aos níveis dos indivíduos controles. Ainda foi observado que a máxima alteração na carga viral foi negativamente correlacionada com a máxima alteração na vitamina C e com a razão de glutatona reduzida pela glutatona total em CD4+ (Aukrust *et al.* 2003).

2.7 As interações entre o HIV, INTRse o dano mitocondrial na infertilidade humana

O AZT e outros INTR utilizados na HAART são potenciais causadores de danos no DNA mitocondrial *in vivo* e *in vitro*. Um dos mecanismos postulados dessa toxicidade é o esgotamento de mtDNA pela inibição do DNA polimerase e diminuição dos polipeptídeos envolvidos no transporte de elétrons (Simon *et al.* 2010; Gerschenson *et al.* 2000).

Como mencionado, os NRTIs inibem no ciclo viral do HIV a transcriptase reversa para reduzir a replicação viral, viremia, e manifestações de doença. Da mesma forma, inibem a síntese de nucleosídeos antirretrovirais do mtDNA que conduz a toxicidade. Estudos evidenciaram que a hipótese do "pol γ ", que liga a inibição da pol γ à (mtDNA) mutação mitocondrial, à depleção do mtDNA e mtDNA, com a toxicidade de nucleosídeos pelos antirretrovirais, associada ao dano tecidual no coração, fígado, músculo esquelético e rim. Defeitos na replicação do mtDNA e diminuição energética são causados por AZT (Kushnir & Lewis 2011; Kohler *et al.* 2007; Kakuda 2000).

No estudo da célula, as mitocôndrias são determinantes centrais no desenvolvimento de oócitos e embriões pré-implantação. Com base na hipótese pol γ de

inibição da replicação do DNA mitocondrial, o potencial reprodutivo de um indivíduo pode ser afetado adversamente por INTRs via dano à biogênese mitocondrial em gametas. A depleção mtDNA tem sido observada em oócitos e espermatozoides dos pacientes que recebem NRTIs (Myer *et al.* 2010, Leruez-Ville *et al.* 2002).

Alguns estudos com animais indicam que a HAART pode diminuir competência reprodutiva. Os efeitos tóxicos diretos do AZT no desenvolvimento de embriões de rato foram demonstrados tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Os dados sugerem que o período crítico de exposição ao AZT ocorre entre a ovulação e a implantação. AZT demonstrou suprimir a divisão celular no embrião pré-implantação (Kushnir *et al.* 2011, Simon *et al.* 2010).

Estudos em macacas *Erythrocebus patas* expostas de forma transplacentária aos NRTIs descreveram dano mitocondrial fetal significativo. Toxicidade mitocondrial foi evidenciada por esgotamento das enzimas do mtDNA e fosforilação oxidativa no coração, músculo esquelético, e da placenta de fetos de macacos expostos ao AZT. Exame de sangue fetal e de cordões umbilicais tiradas de filhotes de macacos não infectados e de bebês humanos nascidos de mulheres com HIV revelou dano mitocondrial induzido pelo NRTIs (Kushnir *et al.* 2011; Ethics Committee 2010; Gerschenson *et al.* 2000).

2.8 Infertilidade masculina e HIV/AIDS

A infertilidade masculina também pode impactar na capacidade reprodutiva dos pacientes masculinos com HIV / AIDS. Parâmetros de avaliação de espermatozoides que refletem a fertilidade são significativamente alterados em homens infectados.

Medidas, incluindo o volume de sêmen, motilidade, concentração e morfologia estão prejudicadas (Simon *et al.* 2010; Tindall *et al.* 1994; Christeff *et al.* 1992).

A análise convencional seminal (avaliação microscópica de parâmetros de sêmen: volume, contagem de espermatozóides, motilidade e morfologia) tem valor limitado na determinação do estado de fertilidade do casal. Por outro lado, o teste de DNA do espermatozóide tem sido cada vez mais reconhecido como um teste promissor. A avaliação de danos ao DNA do espermatozóide é um biomarcador útil da infertilidade, com inúmeros estudos mostrando sua associação com maior tempo para conceber em comparação com os casais férteis, clivagem embrionária prejudicada, taxas de aborto mais elevadas e também um aumento significativo do risco de interrupção da gravidez após fertilização *in vitro* (FIV) e injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI). No entanto, as implicações de danos no DNA do espermatozóide são ainda mais abrangentes. Como o espermatozóide tem poucos mecanismos de reparo e oócitos só podem reparar quantidade limitada de dano, o dano ao DNA do espermatozóide pode afetar a linhagem germinativa de futuras gerações (Nicopoullos *et al.* 2010; Dulioust *et al.* 2002; Leruez-Ville *et al.* 2002).

Ainda mais preocupante do que a sua capacidade de reduzir a fertilidade, é o conhecimento de que os espermatozóides com dano oxidativo ao DNA ainda podem manter o potencial de alcançar o óvulo, promover a fertilização e assim, contribuir para mutações durante o desenvolvimento embrionário ou mesmo para perda do feto. Se o DNA danificado é incorporado no genoma embrionário, pode conduzir a erros na sua replicação, transcrição e tradução, durante a embriogênese, contribuindo para um número de doenças humanas, em apenas uma geração. Em suma, o DNA do espermatozóide pode ter impacto sobre a saúde a curto e longo prazo de crianças

nascidas por terapia de reprodução assistida. Crianças concebidas por reprodução assistida, particularmente ICSI, têm maior incidência de doença do que aquelas concebidas espontaneamente. Continuando na infância, há uma forte associação entre má integridade do DNA do espermatozóide e doenças que vão desde câncer infantil e leucemias até autismo, especialmente se agravado pelo tabagismo paterno (Kushnir *et al.* 2011; Ethics Committee 2010; Yudin *et al.* 2010).

Tradicionalmente, o diagnóstico de infertilidade masculina tem como base a avaliação e análise da concentração de espermatozóides, motilidade e morfologia, utilizando diretrizes da OMS que são atualizadas periodicamente (Leruez-Ville *et al.* 2002). Embora muito progresso tenha sido feito na compreensão da fisiologia do espermatozóide e interação com o ovócito, estas medidas continuam a ser os meios mais importantes e amplamente utilizados na avaliação do fator masculino de infertilidade. No entanto, é amplamente aceito que os parâmetros de sêmen revelam apenas um grau limitado de informações sobre prognóstico e diagnóstico (Dulioust *et al.* 2002). Em alguns casos, a análise de sêmen convencional não é capaz de detectar a presença de alterações sutis em espermatozóides que pudessem afetar a funcionalidade do mesmo. A integridade do DNA do espermatozóide tem sido proposta como um parâmetro adicional de qualidade do sêmen e um potencial preditor de fertilidade. Também tem sido sugerido que a cromatina e a integridade do DNA são essenciais para assegurar a fertilização pelos espermatozóides. Alguns estudos indicaram que os níveis elevados de danos no DNA podem estar associados com os parâmetros que indicam a qualidade do sêmen. Outros, porém, têm demonstrado que a integridade do DNA do espermatozóide é independente dos parâmetros convencionais e sugerem que a avaliação da integridade do DNA pode fornecer informações adicionais valiosas. Danos ao DNA do

espermatozóide têm sido reconhecidos como uma possível explicação para uma proporção significativa dos casos de infertilidade idiopática (Nicopoulos *et al.* 2011; Simon *et al.* 2010; Barboza *et al.* 2004; Politch *et al.*, 1994).

2.9 Avaliação da fertilidade masculina

2.9.1 Espermograma

O espermograma é o foco central da avaliação laboratorial para o homem com queixa de infertilidade (tabela 1). Embora não seja um teste de função espermática, esse exame fornece informações sobre a atividade germinativa, a atividade dos epidídimos e a atividade das glândulas sexuais acessórias. Os resultados do espermograma são frequentemente utilizados como marcadores da fecundidade masculina (Esteves *et al.* 2011; Rhoden 2009). O potencial fértil do homem é influenciado pela atividade sexual, pelo estado das glândulas sexuais acessórias e por fatores definidos como estado de saúde geral, utilização de medicamentos, drogas ilícitas, tabagismo e álcool, etc. (Fathi Najafi *et al.* 2015). Os valores de referência utilizados pelo manual da OMS publicados em 2010 foram estabelecidos com base em resultados de análises seminais de um grupo de aproximadamente dois mil homens de oito países, que foram capazes de engravidar suas parceiras por via natural até um ano após o término da contracepção (Cooper *et al.* 2010).

Tabela 1

Parâmetros seminais conforme ano de atualização pela OMS^a					
Ano Publicação	1980	1987	1992	1999	2010
Volume (ml)	----	≥2,0	≥2,0	≥2,0	≥1,5
Concentração (x 10⁶ por ml)	20-200	≥20	≥20	≥20	≥15
Motilidade total (%)	≥60	≥50	≥50	≥50	≥40
Vitalidade (%)	----	≥50	≥75	≥75	≥58
Morfologia (% normais)	80,5	≥50	≥30	≥14	≥4
Leucócitos (x 10⁶ por ml)	< 4,7	< 1,0	< 1,0	<1,0	< 1,0

^aTabela adaptado de Esteves *et al.* (2012).

2.9.2 Espermograma e HIV

O estudo publicado por Krieger *et al.* (1991) mostrou que todos os homens com AIDS tiveram pioseмия e sêmen significativamente anormal. Em contraste, as amostras de sêmen de soropositivos não diferiram significativamente de sêmen de homens saudáveis soronegativos. Nenhuma anormalidade na contagem de espermatozoides, morfologia, números ou tipos de leucócitos no sêmen, ou outros parâmetros seminais, foi associada com a presença de HIV no líquido seminal. Terapêutica com zidovudina não afetou a morfologia espermática ou as características seminais. Assim, embora os pacientes com AIDS tenham sêmen anormais, os parâmetros laboratoriais que avaliam a fertilidade não foram afetados pela presença do HIV ou do uso de terapia antirretroviral. Bujan *et al.* (2007) compararam a análise de parâmetros seminais de pacientes HIV em diferentes estudos publicados desde 1991. Destacou-se que, nos paciente com HIV, o volume seminal foi menor, mais alcalino, maior motilidade e a morfologia dos

espermatozóides não diferiu do grupo controle. Os resultados demonstram que há alteração na motilidade dos espermatozóides e no volume seminal dos pacientes com HIV em relação ao grupo controle, sendo que muitos deles estavam em uso de antirretroviral (Bujan *et al.* 2007).

Os mecanismos que levam a alteração das variáveis analisadas no espermograma não são conhecidos, mas provavelmente estejam relacionados à penetração tecidual do HIV. Segundo Matusali *et al.* (2015), encontrou-se o vírus da imunodeficiência humana, quando avaliado em animais não tratados e tratados com antirretrovirais, nos tecidos responsáveis pela produção, armazenamento e eliminação do líquido seminal. O sêmen é composto por células e secreções provenientes do trato genital masculino (MGT), que compreende vários órgãos exócrinos (ou seja, os testículos, epidídimos, as vesículas seminais, a próstata e as glândulas bulbouretrais) e dutos (o eferente duto, os canais deferentes, os dutos ejaculatórios, e da uretra) (Dulioust *et al.* 2002). Foi realizada uma investigação completa sobre a contaminação dos órgãos MGT e dutos provenientes de animais tratados e não tratados e foi encontrado um efeito diferencial da HAART, dependendo dos tecidos. HAART levou a níveis medianos indetectáveis de RNA viral na próstata e vasos deferentes e diminuiu significativamente os níveis de RNA no epidídimo e vesícula seminal. O nível de RNA no testículo era extremamente baixo após o tratamento com HAART. Em contraste, na uretra, não houve qualquer diferença significativa no nível RNA e células infectadas ainda foram detectadas após HAART (Pasqualotto *et al.* 2009).

A baixa penetração das drogas é demonstrada em tecidos que apresentam infecção residual em face da HAART, tais como sistema linfático, cérebro e alguns órgãos. Devido à fraca acessibilidade aos órgãos genitais masculinos, os antirretrovirais

nunca foram testados em tecidos genitais masculinos (Mutasali *et al.* 2015). Concentrações de antirretrovirais semelhantes foram encontradas entre todos os órgãos dos tratos genitais masculinos testados. Postula-se que o testículo constitui um santuário viral dentro do MGT. No entanto, o nível muito baixo de carga viral deste órgão em usuários de HAART, em conjunto com a localização das células infectadas no interstício distante do lúmen seminal argumenta contra essa teoria. A uretra exibe um elevado número de células alvo SIV (principalmente macrófagos) em ambos os macacos tratados e não tratados e foi geralmente o órgão que exibiu o mais alto nível de carga viral dentro do MGT (Cooper *et al.* 2010). Um número elevado de macrófagos também foi relatado na uretra de homens saudáveis não infectados. De acordo com os resultados em macacos *in vivo*, a infecção de macrófagos foi recentemente descrita no tecido uretral humano *ex vivo* expostos ao HIV-1. Em conclusão, mostrou-se que há SIV no sêmen de macacos, apesar da HAART drasticamente reduzir a viremia. Esses resultados não estão associados à redução das concentrações de drogas no sêmen, testículos, epidídimos, vesícula seminal ou próstata (Bujan *et al.* 2007). As concentrações de droga na uretra permanecem não testadas. O efeito da HAART é variável entre os MTG. A presença de carga viral na uretra, mesmo em pacientes tratados adequadamente, provavelmente está relacionada à presença do vírus em células de longa permanência como os macrófagos (Bujan *et al.*; 2004; Krieger *et al.*; 1991).

2.9.3 Ensaio cometa e infertilidade masculina

O Ensaio Cometa (EC), “*Single Cell Gel Electrophoresis*”, é uma técnica rápida e eficiente quando usada para quantificar as lesões e detectar os efeitos do reparo no DNA em células individualizadas de mamíferos. Essa metodologia apresenta algumas vantagens sobre os testes bioquímicos e citogenéticos, entre as quais a utilização de um

pequeno número de células que não necessariamente estejam em divisão (Ribas-Maynou *et al.*; 2012; Hughes *et al.*; 1996). As células, previamente lisadas para manter somente o nucléolo, são homogeneizadas em agarose de baixo ponto de fusão fixadas sobre uma lâmina pré-corberta com agarose. Assim, são submetidas a uma eletroforese proporcionando a migração dos fragmentos de DNA do pólo positivo para o negativo resultando. Após a eletroforese, as células que apresentam um núcleo redondo são identificadas como classe de dano zero, sem dano no DNA detectável. Por outro lado, as células lesadas são identificadas visualmente por uma espécie de cauda, similar a um cometa, formada pelos fragmentos de DNA (Tug *et al.* 2011; Lewis & Agbaje 2008). Estes fragmentos podem se apresentar em diferentes tamanhos, e ainda estar associados ao núcleo por uma cadeia simples. Para alguns autores, o tamanho da cauda é proporcional à dimensão do dano que foi causado, mas é de consenso que a simples visualização do “cometa” já significa que danos estão presentes no DNA, podendo ser quebras de fita simples, duplas, *crosslinks*, sítios de reparo por excisão e/ou lesões alcalilábeis (Ramzan *et al.* 2015; Ribas-Maynou *et al.* 2013). A identificação do dano no DNA pode ser feita por diferentes maneiras como, por exemplo, medir o comprimento do DNA migrante com a ajuda de uma ocular de medidas, ou ainda classificar visualmente, em diferentes níveis de dano, as células analisadas, podendo se obter um valor arbitrário que expresse o dano geral sofrido por uma população de células (Vasquez 2012; Speit *et al.* 2009).

2.9.4 Relação do ensaio cometa com infertilidade masculina

O ensaio cometa também tem o potencial de detectar genotoxicidade de células germinativas humanas e pode ser usado para demonstrar a capacidade de uma substância ou metabólito interagir diretamente com o material genético das células gonadais e/ou germinativas. A avaliação da integridade do DNA nos espermatozóides mostra a frequência de espermatozóides contendo DNA fragmentado em homens inférteis em comparação com os férteis (Zini *et al.* 2001). Homens com pobres parâmetros seminais têm maior proporção de espermatozóides com DNA fragmentado do que homens com parâmetros normais de sêmen (Enciso *et al.* 2006). Muitos estudos sugerem que a fragmentação do DNA de espermatozóides poderia influenciar a fertilização, a qualidade do embrião e seu desenvolvimento, formação de blastocisto, e redução das taxas de gravidez (Sakkas *et al.* 2004; Benchaib *et al.* 2003). Existem também alguns estudos que mostram a falta de associação entre danos ao DNA do espermatozóide e qualidade embrionária ou taxa de gravidez (Zini *et al.* 2005).

O ensaio do cometa é uma ferramenta útil para medir efeitos genotóxicos no espermatozóide de seres humanos expostos a fatores ambientais. Estudos de biomonitorização humana usando o teste do cometa em espermatozóides sugerem que os efeitos genotóxicos podem ser detectados após vários tipos de exposição. Os estudos referem possíveis fatores de confusão provenientes de situações intrínsecas ao método e ao organismo (Speit *et al.* 2009). No que diz respeito a fatores de confusão, considera-se a influência da idade sobre os resultados do ensaio do cometa no espermatozóide humano. Homens com mais de 35 anos tiveram um aumento estatisticamente significativo no número de células com danos no DNA pelo ensaio cometa neutro em comparação com o homem jovem (Ribas-Manynou *et al.* 2014). Estudos relatam

aumento de danos ao DNA de espermatozóides em homens mais velhos quando usado o teste cometa alcalino (Ribas-Manynou *et al.* 2012). Outros fatores considerados foram os hábitos de vida e ambientais. O ensaio cometa *in vivo* com células gonadais de animais pode ser um teste promissor para genotoxicidade em células germinativas. No entanto, um protocolo padrão (seguindo as diretrizes para ensaio do cometa com tecidos somáticos *in vivo*), incluindo adequado horário de exposição a agentes genotóxicos e tempos de amostragem precisa ser estabelecido e validado (Lewis *et al.* 2008).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostra

Foram entrevistados 200 pacientes homens com testes de HIV positivos, acima de 18 anos, atendidos no Ambulatório Central da Universidade de Caxias do Sul e do Ambulatório de Infectologia do município de Caxias do Sul, no período de junho a novembro de 2014. Foram excluídos os pacientes em tratamento para hepatite B ou C, com doença sexualmente transmissível no momento da coleta, em reposição hormonal, em tratamento quimioterápico ou radioterápico por neoplasia. Um quarto dos entrevistados aceitou realizar a coleta seminal e assinar o termo de consentimento livre e esclarecido. Destes 50 pacientes, 2 foram excluídos das análises devido ao índice de dano zero e 1 foi excluído por azoospermia, totalizando 47 pacientes.

3.2 Coleta da amostra

A coleta seminal foi realizada na Clínica de Reprodução Humana *Conception* localizada em Caxias do Sul, uma vez por semana, respeitando RDC nº 23 de 2011 da Vigilância Sanitária (anexo 1), com tempo de abstinência de pelo menos 3 dias.

3.3 Análise seminal

A análise seminal compreendeu: características físicas do sêmen, que incluíram coagulação, liquefação, viscosidade, aspecto, cor e pH; volume da amostra; avaliação microscópica, que incluiu a concentração de espermatozoides, motilidade espermática, vitalidade espermática, morfologia espermática e quantificação do número de leucócitos.

3.3.1 Avaliação macroscópica das características físicas do sêmen

Imediatamente após a ejaculação, o sêmen normal forma um coágulo semelhante a um gel, em razão da presença de proteínas secretadas pelas vesículas seminais (semenogelina, fibronectina e lactoferrina). A liquefação do coágulo seminal é um processo enzimático e a principal enzima envolvida é o antígeno prostático específico (PSA). Depois da observação da presença ou não do coágulo, o frasco com a amostra seminal foi colocado em uma estufa, à temperatura de 37 °C. O tempo médio para a liquefação completa foi de 15 a 30 minutos. A viscosidade do sêmen foi avaliada após a liquefação, com o auxílio de uma pipeta sorológica de 5 ml. A viscosidade foi considerada normal quando a amostra, ao sair da pipeta por ação somente da força da gravidade, gotejou ou formou um filamento com extensão inferior a 2 cm. Quando o filamento formado foi superior a 2 cm, a viscosidade foi descrita como aumentada. O aspecto do sêmen é modificado à medida que os processos de coagulação e liquefação acontecem. As colorações branca ou acinzentada são consideradas normais. O pH seminal é resultado da mistura das secreções das vesículas seminais (pH alcalino) e da próstata (pH ácido). O valor normal do pH seminal é $\geq 7,2$. Após a coleta, o frasco com a amostra seminal permaneceu bem fechado para evitar evaporação do CO₂ da amostra e alteração do sistema tampão. A determinação do pH foi realizada utilizando-se papel de indicador de Ph. O volume seminal foi avaliado pela sua densidade. Assim, o frasco coletor foi pesado antes e depois da coleta. Sabendo-se que a densidade do sêmen é de 1 g por ml, calcula-se o volume pela diferença entre as pesagens. O volume seminal foi medido com auxílio de uma pipeta sorológica graduada de 5 ml, com intervalo de 0,1 ml, aspirando-se toda amostra colhida após a liquefação.

3.3.2 Volume

O volume seminal foi avaliado pela sua densidade. Assim, o frasco coletor foi pesado antes e depois da coleta. Sabendo-se que a densidade do sêmen é de 1 g por ml, calcula-se o volume pela diferença entre as pesagens. O volume seminal foi medido com auxílio de uma pipeta sorológica graduada de 5 ml, com intervalo de 0,1 ml, aspirando-se toda amostra colhida após a liquefação.

3.3.3 Avaliação microscópica das características do sêmen

3.3.3.1 Agregação e aglutinação

Após a análise macroscópica, realizou-se a avaliação microscópica inicial quanto à presença de agregação e de aglutinação. Para isso, 20 µL do sêmen liquefeito foram colocados sobre uma lâmina de microscopia e recobertos com lamínula. Avaliou-se a alíquota com microscopia óptica com contraste de fase utilizando magnificação de quatrocentas vezes. Avaliaram-se dois tipos de aglutinação: (1) inespecífica (também conhecida como agregação, em que foram observados espermatozoides imóveis aderidos a células ou debris celulares); (2) específica (espermatozoides aderidos uns aos outros). Esta última é sugestiva da presença de anticorpos antiespermatozóides.

3.3.3.2 Motilidade espermática

A motilidade é definida como o movimento espontâneo dos espermatozoides. A determinação do percentual de espermatozoides móveis e sua progressão foram realizadas manualmente. Na avaliação manual, uma alíquota do sêmen liquefeito foi avaliada sob microscopia óptica, com contraste de fase, utilizando-se aumento de duzentas ou quatrocentas vezes, à temperatura de 37 °C (placa aquecedora acoplada ao microscópio). Os espermatozóides foram classificados de acordo com três padrões de

motilidade (World Health Organization, 2010): motilidade progressiva, motilidade não progressiva e imóveis. Pelo menos duzentas células são avaliadas, e o cálculo final é expresso em termos percentuais. Inicialmente, contaram-se os espermatozoides que exibiram motilidade progressiva. A seguir, contaram-se os que exibiram motilidade não progressiva, bem como os imóveis, no mesmo campo visual. O processo foi realizado em duplicata e, ao final, a média foi utilizada para estabelecer o percentual de espermatozoides móveis (motilidade total) e daqueles com motilidade progressiva.

3.3.3.3 Concentração espermática

A concentração espermática foi definida como o número de espermatozóides em milhões por mililitro de sêmen ($\times 10^6$ por ml), sendo determinada pela diluição volumétrica associada à hematocitometria. A contagem dos espermatozoides foi realizada por meio de uma câmara de Neubauer modificada, que apresenta duas câmaras, uma superior e outra inferior. Cada uma possui 0,100 mm de profundidade e um retículo central contendo 25 quadrados grandes, cada um com 16 quadrados menores. Para se determinar a concentração espermática, contou-se o número de espermatozóides presentes nos 25 quadrados grandes (cinco fileiras) de ambas as câmaras, obtendo-se a média entre as duas contagens. Utilizou-se microscopia óptica comum com magnificação de duzentas vezes para a observação dos espermatozoides. A concentração de espermatozoides em milhões por mililitro foi resultante da média daqueles contados pelo fator de diluição da câmara. A contagem total (do ejaculado) foi obtida multiplicando-se o valor da concentração de espermatozoides pelo volume da amostra seminal, e o resultado foi expresso em milhões de espermatozóides por ejaculado.

3.3.3.4 Concentração de células redondas e leucócitos

Normalmente, a amostra seminal possui outros elementos celulares além dos espermatozoides, como células epiteliais do trato geniturinário, células prostáticas superficiais ou colunares, e células germinativas imaturas como espermátócitos e espermátides. A determinação da concentração desse grupo de células referidas como “redondas” foi realizada empregando-se a mesma metodologia descrita para a determinação da concentração de espermatozoides.

Os resultados do espermograma seguiram os valores de referências enumerados:

1. Coloração: esbranquiçada ou amarelada;
2. Volume: 2 a 5 ml;
3. Viscosidade: Normal;
4. pH: 7,2 – 8,0;
5. Concentração: $\geq 15 \times 10^6/\text{ml}$;
6. Total de espermatozoides: $\geq 39 \times 10^6/\text{ml}$;
7. Motilidade Total: $\geq 32\%$;
8. Células Redondas: $< 1 \times 10^6/\text{ml}$;
9. Aglutinação: ausente;
10. Morfologia: $\geq 4\%$.

Após realizar o espermograma, o volume restante de cada amostra foi transportado em caixa de isopor lacrado com fita crepe, pela pesquisadora, em carro próprio até o laboratório de HIV/AIDS da Universidade de Caxias do Sul, localizado no BLOCO S, que apresenta nível 2 de bio segurança, permitindo a manipulação e descarte da amostra adequadamente.

3.3.4 Ensaio cometa alcalino

Chegando ao laboratório, essa amostra foi submetida ao ensaio cometa. A inclusão de células (7,5 μL de amostra) foi feita com 92,5 μL de agarose de baixo ponto de fusão (0,7%) e imediatamente espalhadas sobre uma lâmina de vidro pré-coberta com agarose (1,5%) e coberta com uma lamínula. Após endurecimento por cerca de 5 minutos a 4°C, a lamínula foi retirada, passando para a etapa da lise.

As lâminas foram dispostas em cubetas verticais, cobertas com solução de lise gelada (Triton X-100 1%: NaCl 2,5M, Na-EDTA 100mM, Tris 10mM, DTT 4mM, pH 10-11) e mantidas imersas por 30 minutos a 4°C. Após, as lâminas foram dispostas em cuba de eletroforese horizontal contendo solução alcalina gelada (300mM NaOH e 1mM EDTA pH > 13) por 20 minutos, para facilitar o desenovelamento do DNA. Posteriormente, foi realizada eletroforese (300mA e 25V) durante 20 minutos. A neutralização foi feita com (0,4M Tris, pH 7,5) por 5 minutos por 3 vezes e coradas com nitrato de prata (nitrato de amônio 0,02%, nitrato de prata 0,02%, ácido tungstosilícico 0,1%, formaldeído 0,05%). As lâminas foram imediatamente cobertas pela solução de coloração e mantidas em shaker sob agitação a 37°C durante 30 minutos. A fixação dos materiais foi realizada em cubeta vertical. As lâminas foram cobertas por solução de fixação (ácido tricloroacético 15%, sulfato de zinco heptahidratado 5%, glicerol 5%) durante 10 minutos, lavadas por três vezes com água destilada e colocadas para secar em temperatura ambiente até o dia seguinte. Para as análises, 200 cometas por indivíduo foram aleatoriamente selecionados (100 células em cada lâminas). Os cometas (fig. 4) também foram classificados em 5 classes de danos, denominadas de Classe 0 a Classe 4. A classe 0 corresponde aos cometas sem cauda; a classe 1 a cometas com pequena cauda; a classe 2 a cometas com danos médios; a classe 3 a cometas com danos intermediários/intensos e a classe 4 corresponde aos cometas com dano máximo. Não foram considerados cometas que apresentaram características de apoptose.

Foram utilizados dois índices de análise visual: Índice de Danos e a Percentagem de Frequência de Danos (% FD). A % FD foi calculada como a percentagem de ocorrência de danos em cada classe (classe 0 - 4) pelo total de cometas contados:

$$\% FR = [(n \text{ de determinada classe} \cdot 100) / n \text{ total de cometas}]$$

O Índice de danos (ID) foi calculado como o total de produtos da multiplicação entre o número de cometas de cada classe e o dígito denominador da classe (0 - 4):

$$ID \text{ total} = 0.(n \text{ classe } 0) + 1.(n \text{ classe } 1) + 2.(n \text{ classe } 2) + 3.(n \text{ classe } 3) + 4.(n \text{ classe } 4)$$

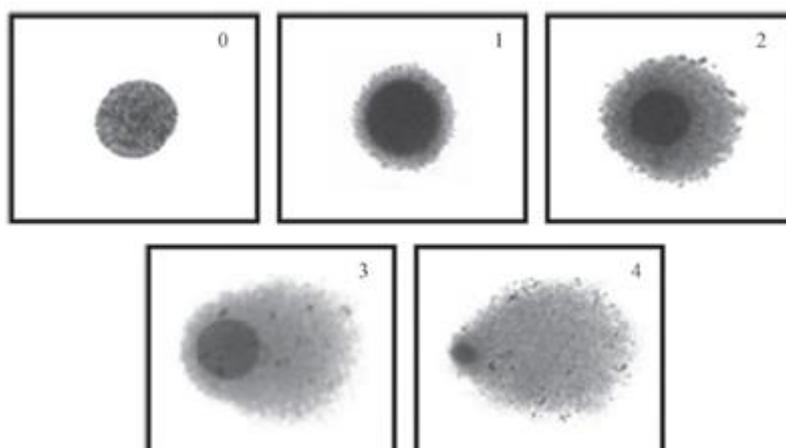


Figura 4. Classes de danos pelo Ensaio Cometa Alcalino. A classe 0 corresponde aos cometas sem cauda, classe 1 a cometas com pequena cauda, classe 2 a danos médios, classe 3 danos intermediários/intensos e a classe 4 com dano máximo. Adaptada de Collins *et al.* 1997.

O descarte dos reagentes foi feito por meio do armazenamento em recipiente adequado, o qual foi devidamente identificado com o código gerador, data, pH final do resíduo, nome do resíduo, listagem de seus componentes majoritários e minoritários. Os componentes biológicos isolados foram descartados em saco leitoso infectante assim como os frascos que os armazenavam.

3.3.5 Contagem de linfócitos T CD4+ e carga viral sérica

Cada paciente realizou, no momento do diagnóstico ou conforme rotina de cada serviço de Infectologia, a coleta de sangue para mensurar os valores de LINFÓCITOS T CD4+ (células/ μ L) e CARGA VIRAL (cópias/ml) do HIV. Os testes foram realizados pelo laboratório da Prefeitura Municipal de Caxias do Sul, sendo que foram utilizados os resultados de no máximo 6 meses antes da coleta.

As amostras de sangue foram processadas conforme as metodologias: 1. PCR Quantitativo HIV: *Abbott Realtime HIV1*; 2. Contagem de linfócitos T CD4+: citometria de fluxo com marcador de linfócito CD45+ – Facscalibur – Multitest (anexo 2 e 3). Os testes são validados por um sistema de qualidade do Ministério da Saúde chamados de Avaliação Externa da Qualidade dos Testes para Contagem de Linfócitos T CD4+/CD8+ e Avaliação Externa da Qualidade dos Testes de Carga Viral do HIV.

O Teste do HIV-1 da *Abbott RealTime*, aprovado para uso nos Estados Unidos, em maio de 2007 e que funciona no sistema m2000, é o único teste de carga viral do seu gênero que pode detectar e medir todos os efeitos dos grupos M, N e O do HIV-1, bem como subtipos não-B do vírus. O teste de HIV-1 da *RealTime* usa o novo *Abbott m2000*, um sistema automático que utiliza em tempo real a reação em cadeia da polimerase (PCR) para ampliar, detectar e medir os níveis do vírus nas amostras de sangue, bem como níveis extremamente elevados destes agentes infecciosos. A PCR em tempo real permite a identificação de grandes quantidades de DNA a partir de amostras muito pequenas em um curto período de tempo, tornando possível detectar níveis extremamente baixos de material genético de um vírus (Abbott 2015).

No teste Facscalibur – Multitest, o reagente MULTITEST é desenvolvido para uso em um citômetro de fluxo equipado com computador e software apropriado. O citômetro é equipado com um laser 488nm e 635nm e é capaz de detectar a dispersão da luz (frontal e lateral e ou ortogonal) e fluorescência de quatro cores dos seguintes comprimentos de ondas: 515-545nm, 562-607nm, maior que 650nm, e 650nm. Utiliza-se um tubo TruCount por paciente para a marcação com o reagente Multitest (CD3/CD4/CD8/CD45). Quando a amostra de sangue é adicionada ao reagente, anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos ligam-se especificamente em antígenos de superfície das células. O botão (*pellet*) liofilizado do tubo truCount se dissolve soltando um número conhecido de microesferas fluorescentes. A solução de Facslysing é utilizada para a lise dos eritrócitos. Durante a análise, o número absoluto de células CD3+/CD4+/CD8+/CD45+ da amostra poderá ser determinado pela divisão do número de eventos celulares positivos pelo número de microesferas fluorescentes, então pela multiplicação da concentração das microesferas. O Kit Multitest utilizado para quantificação das subpopulações linfocitárias CD4+/CD8+ contém o reagente CD3+/CD4+/CD8+/CD45+ e tubos trucount suficientes para 50 testes. O reagente contém 0,5 ml de PBS com gelatina bovina e 0,1% de azida sódica. Os tubos Trucount contêm um botão liofilizado de microesferas de 4,2 µm fluorescentes. O CD3+ é o marcador exclusivo da linhagem T. O CD4+ é o marcador da subpopulação de linfócitos T auxiliares, mas também está presente em baixa expressão nos monócitos e nos macrófagos e o CD8+ é o marcador da subpopulação de linfócitos T citotóxicos, mas também está presente em baixa expressão nas células Natural Killer (NK). O CD45+ é o marcador de leucócitos (Becton and Dickinson Company 2011).

4. RESULTADOS

O cálculo amostral foi realizado a partir do estudo de Dobrzyńska et al.(2010).A análise foi realizada utilizando-se Nível de Significância 5%, Poder 80%, por meio do *Software WinPepi* versão 10.4, totalizando 52 pacientes, sendo 26 *naive* e 26 em uso de HAART. No entanto, obteve-se um total de 50 pacientes, sendo 18 em uso de TARV (Fig.5). A amostra, posteriormente, sofreu redução, devido à ausência de espermatozóides e ao índice de dano zero, para 46 amostras de líquido seminal.

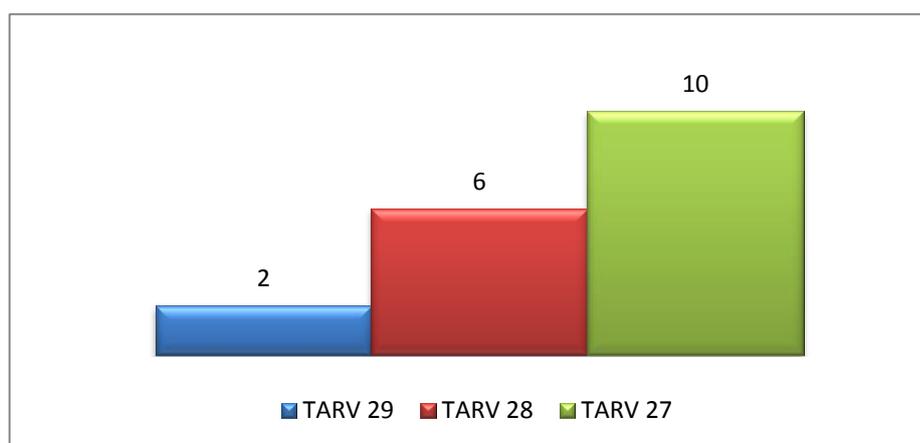


Figura 5. Distribuição dos participantes usuários de TARV. Número absoluto dos participantes em grupos de TARV: 29 (outra combinação) com 2 pacientes, 28 (NNRTIs, NRTIs e PIs) com 6, e 27 (NRTIs e NNRTIs) com 10.

O tempo de uso da terapia antirretroviral encontrado variou de 213 dias até 785 dias, tendo uma média de 470 dias. Em relação à idade, o presente estudo apresentou extremos de idade de 21 a 73 anos e uma média de 38 anos.

Em relação à raça, 44 dos 50 pacientes entrevistados eram brancos, 2 eram negros e 4 pardos. Esses dados conferem com a região serrana do Rio Grande do Sul, que basicamente contém descendentes de italianos e alemães. A maioria dos participantes (34/50) era procedente de Caxias do Sul.

No que se refere ao estado civil (Tabela 2), notou-se uma grande diversidade, destacando-se a condição de viúvo em 9 de 50 casos. Tivemos 8 divorciados, 7 casados, 6 em união estável e 5 solteiros. Na pesquisa da opção sexual, 36 de 50 revelaram ser heterossexuais e 11 homossexuais.

Tabela 2

Dados totais dos pacientes participantes da pesquisa.	
Características	Resultados (n=50)
Idade	39,56 ± 12,38
Opção Sexual	
Hetero	36 (72%)
Homo	11 (22%)
Bi	3 (6%)
Raça	
Branca	44 (88%)
Negra	2 (4%)
Parda	4 (8%)
Estado Civil	
Solteiro	26 (46%)
União Estável	6 (12%)
Casado	11 (22%)
Divorciado	5 (10%)
Viúvo	2 (4%)
Utilização de TARV	
Sim	22 (44%)
Não	28 (56%)
Dado apresentados com média ± dp ou n (%)	

Quando pesquisado o nível de escolaridade (Fig. 6), a amostra conteve mais de 50% de participantes com ensino médio incompleto ou abaixo. Em oposição, 11 de 50 participantes têm nível superior e apenas 1 é analfabeto.

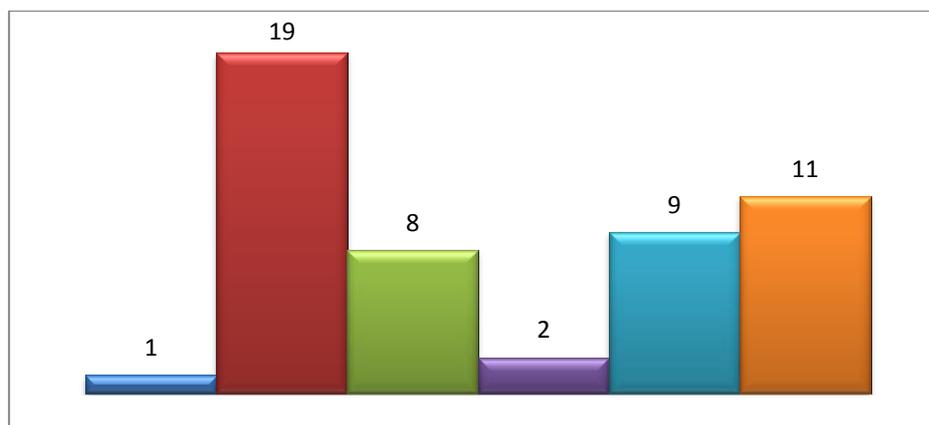


Figura 6. Distribuição dos pacientes conforme escolaridade. Em número absoluto acima das colunas: analfabeto 1, ensino fundamental incompleto 19, fundamental completo 8, médio incompleto 2, médio completo 9 e ensino superior 11.

Em relação à sorologia para HIV dos parceiros dos pacientes estudados, 36 de 50 não são portadores de HIV, sendo que 5 desconhecem a condição sorológica do seu cônjuge. Entretanto, 9 têm parceiros infectados que fazem tratamento regular. Entre os 50 pacientes estudados, 58% já tem filhos e 68% não pretende ter descendentes. A maioria dos pacientes não estava co-infectado com hepatite B e C e não apresentava nenhuma outra doença sexualmente transmissível no momento da coleta da amostra.

Na amostra estudada, 28% eram tabagistas, 50% eram etilistas e 20% eram usuários de drogas ilícitas (Tabela 3). A maioria não faz nenhuma atividade física regularmente e não apresenta doenças crônicas como: hipertensão arterial sistêmica, diabetes *mellitus* ou dislipidemia (Tabela 3).

Tabela 3

Dados totais dos pacientes quanto à comorbidade, atividade física e ingestão de café.	
Características	Resultados (n=49)
Comorbidade	
Sim	18 (34,69 %)
Não	31 (63,26 %)
Ingestão de Café	
Sim	41 (83,67 %)
Não	16 (32,65 %)
Atividade Física	
Sim	17 (34,69 %)
Não	64 (65,30 %)
Dado apresentados com n (%)	

Em relação aos dados relacionados, a tabagismo, etilismo e drogas, encontrou-se a frequência de dano conforme a fig. 7, mas não ocorreu diferença estatisticamente significativa entre as variáveis analisadas.

Ao serem analisados os linfócitos TCD4+, a média de CD4+ foi 473 células/ μ L, o valor máximo de 1828 células/ μ L e o mínimo de 29 células/ μ L. A carga viral teve média de 102.719 cópias/ml, considerada elevada, e o valor mais alto de 931.313 cópias/ml.

Foram estudados os índices (Fig.7) e frequência de dano (Fig. 8), e os resultados do índice de dano foram: 155,69 (média) e 364 (máximo). Em relação a frequência de dano os valores foram: 70,90% (média) e 100% (máxima).

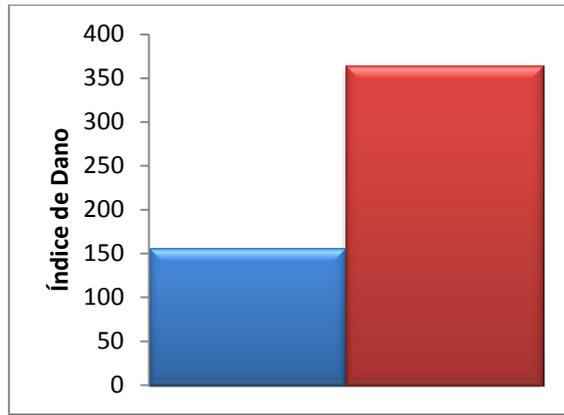


Figura 7. Índice de Dano da amostra. Resultado do Cometa Alcalino, sendo a média (155,69) em azul e o valor máximo (364) em vermelho.

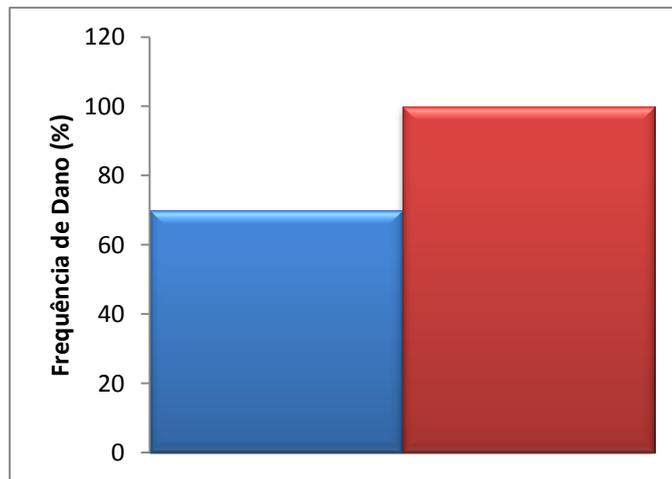


Figura 8. Frequência de Dano do Cometa Alcalino. Apresentou a média (70,09%), em azul, e a máxima (100%), em vermelho.

Em relação aos dados relacionados a tabagismo, etilismo e drogas (Fig. 9), encontrou-se a Frequência de Dano conforme a figura abaixo, mas não ocorreu diferença estatisticamente significativa entre as variáveis analisadas.

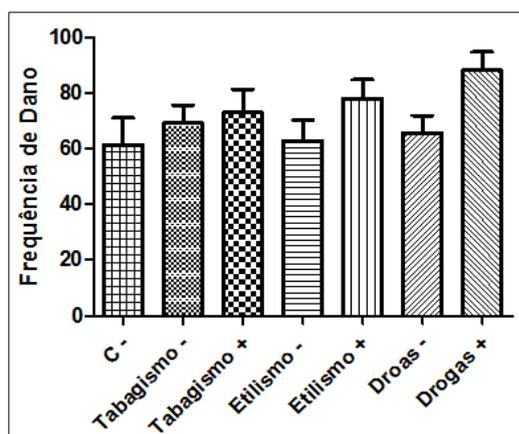


Figura 9. Frequência de Dano nos usuários de HAART. Porcentagem de dano associado com (+) ou sem (-) tabagismo, etilismo, drogadição. O grupo controle está representado pelo (C-) e tem 60% de frequência de dano. Os adictos a drogas têm a maior frequência, 90%.

Os resultados (Fig. 10 e 11) expressam a relação do Índice de Dano e o tempo de uso da terapia antirretroviral da amostra total. Os resultados ficaram dispostos em grupos divididos em 1 (nenhum dia de uso) com 183,03; 2 (1 a 1.000 dias) com 138,46; e 3 (1.001 a 10.000 dias) com 92,92 de Índice de Dano. Observa-se que, quanto maior o tempo de uso regular dos antivirais, menor é o índice de dano, observando-se um fator protetor. Quando analisada a frequência de dano, os valores foram: 1 (74,36), 2 (62,81) e 3 (63,97).

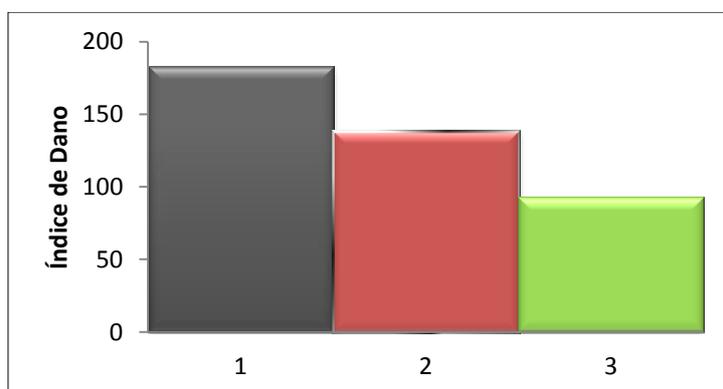


Figura 10. Índice de Dano x uso HAART em dias. Divididos em grupos: 1 (nenhum dia), 2 (1 a 1.000 dias) e 3 (1.001 a 10.000 dias) com os respectivos resultados 183, 138 e 92 aproximadamente.

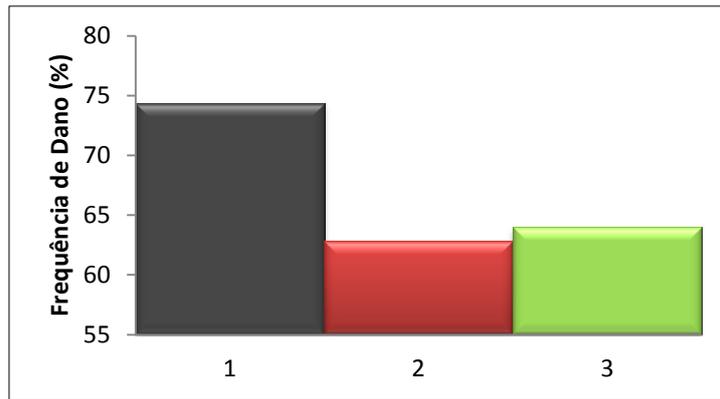


Figura 11. Frequência de Dano x uso de HAART em dias. Resultados por grupos: 1 (nenhum dia), 2 (1 a 1.000 dias) e 3 (1.001 a 10.000 dias) com os respectivos resultados 74%, 62%, 63% aproximadamente.

Na avaliação da genotoxicidade entre usuários da terapia antirretroviral e *naive*, nota-se que fazer tratamento para o HIV, independentemente do tempo, reduz o índice e a frequência de dano ao espermatozóide, respectivamente (Fig. 12 e 13). O número 1 representa estar com HAART e o grupo 2, ser *naive*.

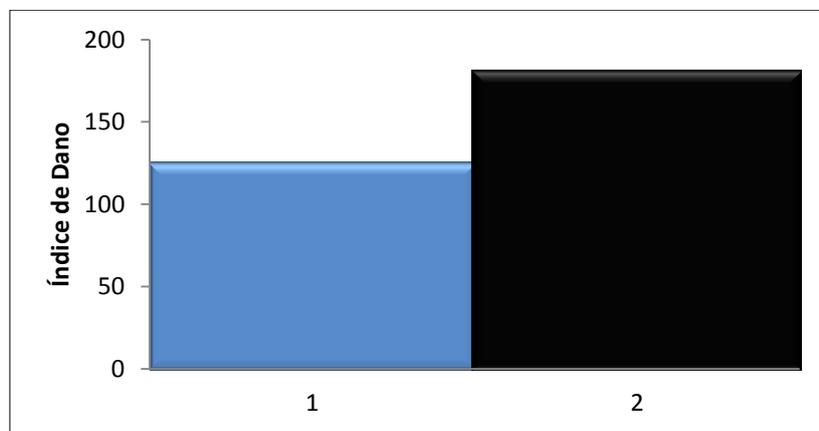


Figura 12. Índices de Dano em usuários de HAART e *naive*. O número 1 representa uso de HAART e o grupo 2, ser *naive*, com os respectivos resultados 124 e 179 aproximadamente.

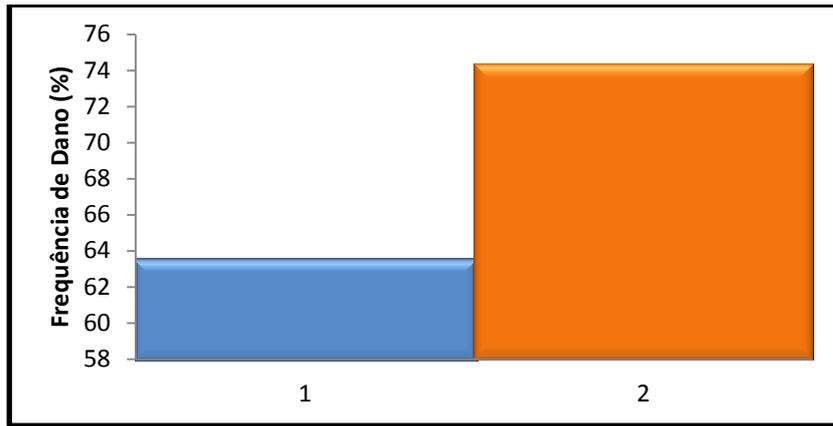


Figura 13. Frequências de Dano em usuários de HAART e naive. O número 1 representa uso de HAART e o grupo 2, ser *naive* com os respectivos resultados 63% e 74% aproximadamente.

Ao ser analisada a carga viral com a frequência e o índice de dano (fig.14 e 15), verificou-se que, quanto maior a viremia, pior é a genotoxicidade espermática. Os números 1, 2 e 3 representam ordenadamente: carga viral indetectável, carga viral de 40 a 10.000 cópias/ml e maior de 10.000 cópias/ml.

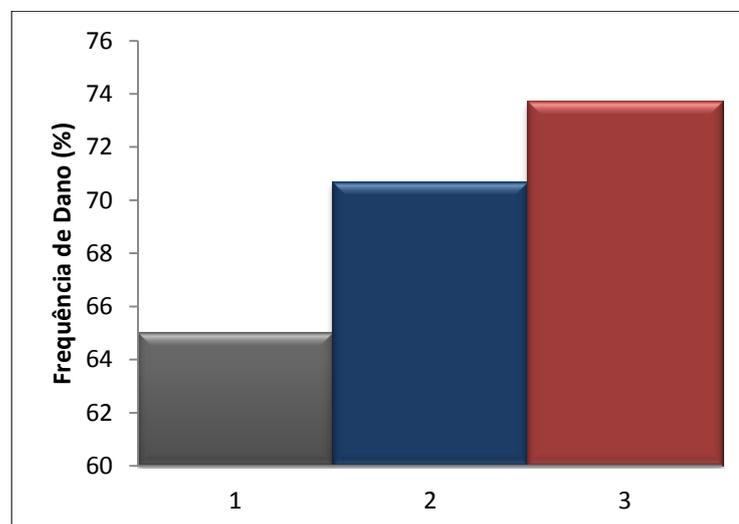


Figura 14. Frequências de Dano e carga viral. Os grupos foram divididos em indetectável (1), carga viral de 40 a 10.000 cópias/ml (2) e maior de 10.000 cópias/ml (3), cujos resultados respectivos foram 65%, 70% e 73% aproximadamente.

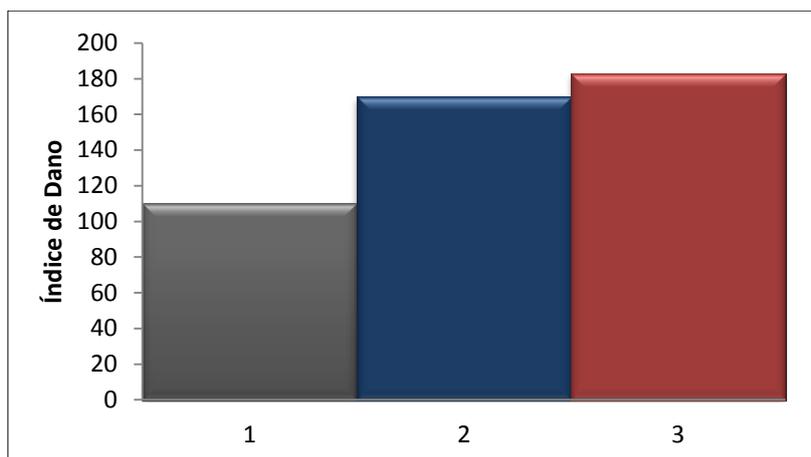


Figura 15. Índices de Dano e carga viral. Os grupos foram divididos em indetectável (1), carga viral de 40 a 10.000 cópias/ml (2) e maior de 10.000 cópias/ml (3), cujos resultados respectivos foram 109, 169 e 182 aproximadamente.

4.1 Análise estatística

Os dados foram analisados pelo *software SPSS* versão 21. As variáveis estudadas não demonstraram resultado significativo em função do tamanho da amostra, que inicialmente deveria ser de 52, mas após novo estudo, estimou-se em 78 a partir de um p muito próximo a 0,05 nas seguintes variáveis: viscosidade e coloração do espermograma, quando associado à carga viral da amostra estudada. Na correlação estatística do Ensaio Cometa (Índice de dano) com o volume, encontrou-se um p de 0,056 pelo teste de *Mann-Whitney*. As demais variáveis do estudo não apresentaram tendência de proximidade ao nível de significância prevista no estudo.

Paralelamente, utilizamos o *software Prism 6* por meio dos testes paramétricos *One Way ANOVA: Tukey's Multiple Comparison Test* e *Dunnnett's Multiple Comparison Test*.

O *Tukey's Multiple Comparison Test* foi realizado analisando as variáveis “estar sem uso de HAART” (*naive ou grupo controle*) e “estar em uso” dos esquemas TARV 1(F27): NtRTIs e NNRTIs, TARV 1 (F28): NtRTIs, NNRTIs e PIs e TARV 1 (F29):

outras combinações. Encontrou-se diferença significativa quando comparadas as variáveis TARV 2 e TARV 1(F28) e (F29) com o índice de dano. Ou seja, usar os esquemas F28 e F29 reduz o índice de dano quando comparado com pacientes que não utilizam nenhuma HAART. A correlação entre os pacientes *naive* e os usuários do esquema NtRTIs e NNRTIs não foi significativa.

Entretanto, para o teste *Dunnett's Multiple Comparison* encontrou-se diferença estatisticamente significativa entre os *naive* e os pacientes dos 3 grupos de TARV, demonstrando que usar antirretroviral reduz o índice de dano ao DNA dos espermatozoides.

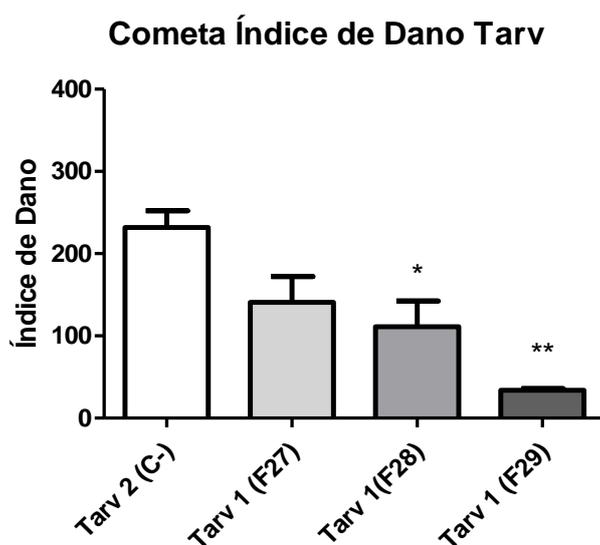


Figura 16. Índice de dano x TARV (C-), TARV 1 (F27), TARV 1 (F28) e TARV 1 (F29). Os * e ** indicam a correlação significativa entre os grupos TARV 1 (F28) e TARV 1 (F29) com o grupo controle.

A avaliação foi realizada também com a frequência de dano (Fig. 17), sendo que pelo Teste de *Tukey* houve significância entre as correlações: *naive* e TARV 1 (F29) e TARV 1 (F27) e TARV 1 (F29). Esses resultados demonstram que o esquema (F29)

reduz muito a genotoxicidade espermática quando comparado aos *naive* e aos esquemas com NtRTIs e NNRTIs. Os intervalos de confiança de ambos, respectivamente, foram: 23,68 a 91,33 e 3,236 a 77,11. Pelo teste de *Dunnnett*, encontrou-se correlação entre não usar TARV e o esquema (F29) que apesar de uma amostra menor em todas as análises mostrou reduzir índice e frequência de dano.

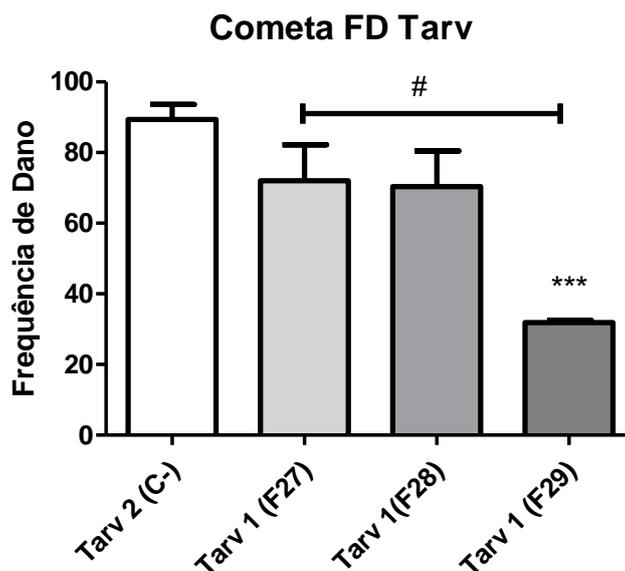


Figura 17. Frequência de dano expresso em % (porcentagem) x TARV (C-), TARV 1 (F27), TARV 1 (F28) e TARV 1 (F29).O *** indicam a correlação significativa do TARV 1 (F29) com o grupo controle (C-) e o # indica correlação estatisticamente significativa entre TARV1 (F27) com a TARV 1 (F29).

Foi avaliada também a associação entre níveis de carga viral com o índice e a frequência de dano (Fig. 18 e 19). Pelos testes de *Tukey* e *Dunnnett*, quando analisado o índice de dano com os níveis de carga viral até 40 cópias/ml, acima de 40 a 10.000 cópias/ml e acima de 10.000 cópias/ml, verificou-se que ter carga viral indetectável (menor de 40 cópias/ml) confere um menor índice de dano, comparando-se com carga

viral detectável. Já no cruzamento dos mesmos dados com a frequência de dano, não se encontrou relação estatisticamente significativa.

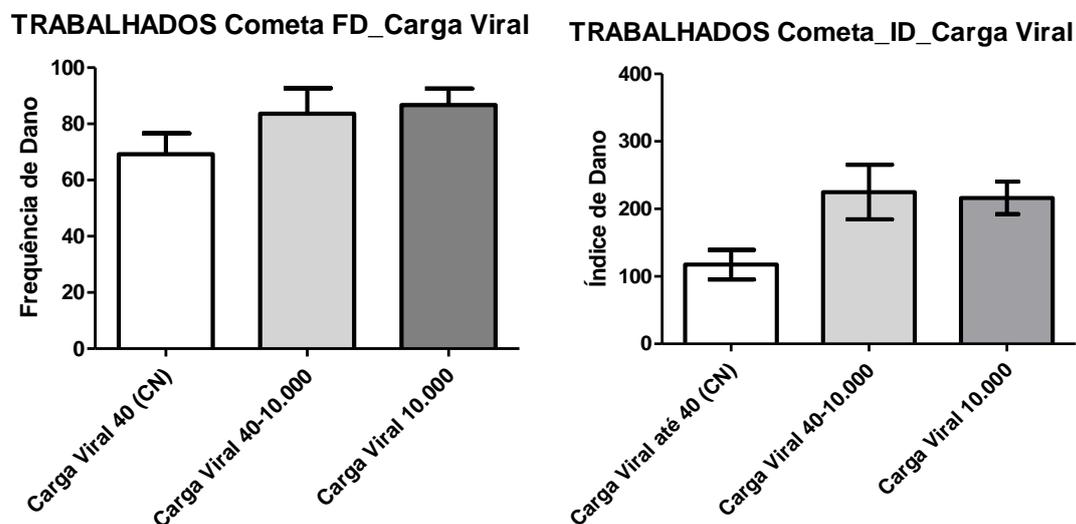


Figura 18 e 19. Frequência à esquerda (%) x Índice de danos à direita (número absoluto) associados à carga viral menor que 40 cópias/ml, acima de 40 a 10.000 cópias/ml e acima de 10.000 cópias/ml.

O tempo em dias de uso regular de HAART foi analisado em faixas distintas (nenhum dia, até 1.000 dias e acima um mil até 10.000 dias) com o índice de dano (fig. 20), sendo encontrada correlação, pelo teste de *Dunnnett*, entre “nenhum dia” ou qualquer faixa de dias de uso. Pelo Teste de *Tukey*, houve correlação entre “nenhum dia” de uso e acima de 1.000 a 10.000 dias de uso de HAART. Esse resultado reforça que a HAART reduz do índice de dano diferentemente da frequência de dano que, quando comparada essas variáveis acima, não teve diferença estatisticamente significativa.

Avaliou-se também o índice e a frequência de dano, pelos testes *Dunnnett* e *Tukey*, comparando-se os esquemas TARV 1 (F27): NtRTIs e NNRTIs, TARV 1 (F28): NtRTIs, NNRTIs e PIs e TARV 1 (F29): outras combinações, entre eles. No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa.

TRABALHADOS Cometa_ID_Tarv Dias

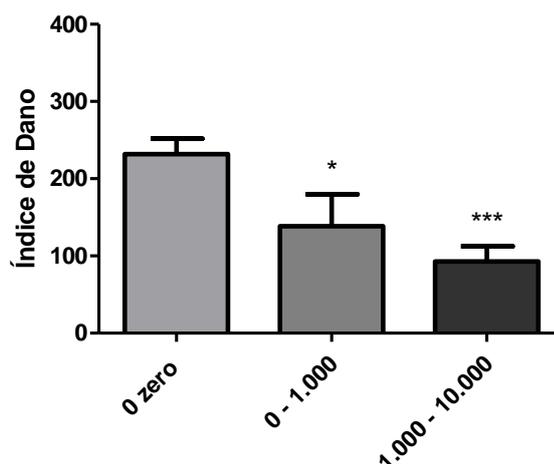


Figura 20. Índice de dano (número absoluto) x número em dias de uso HAART. Os * e *** indicam correlação significativa quando associados uso até 1.000 dias e acima de 1.000 até 10.000 dias a nenhum dia de uso HAART.

Entre os usuários de HAART e os não usuários, avaliaram-se as classes de dano (Fig. 20 e 21) no DNA dos espermatozoides como segue pela frequência de dano.

Usuários de Tarv

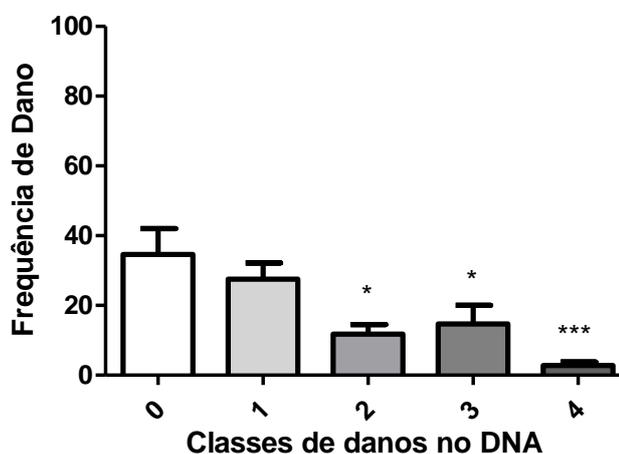


Figura 21. Frequência de danos expresso em % (porcentagem) por classes de dano 0, 1, 2, 3 e 4 em usuários de HAART. Os asteriscos * e *** indicam que as classes 2, 3 e 4 são estatisticamente menores em reação a classe 0. E a classe 4 em relação a 2 e 3.

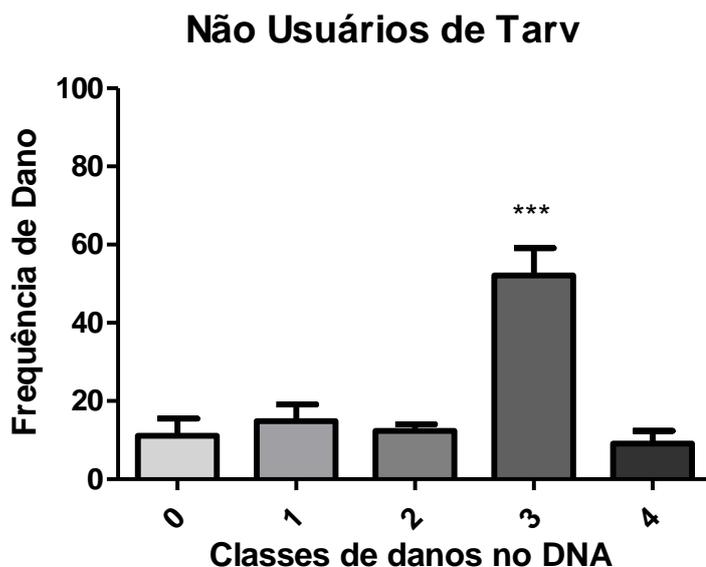


Figura 22. Frequência de danos expressa em % (porcentagem) por classes de dano 0, 1, 2, 3 e 4 em não usuários de HAART. A classe 3 de dano em relação às demais é estatisticamente significativa.

Analisaram-se as classes de dados conforme grupos de usuários de HAART (fig. 23, 24 e 25) divididos em TARV 1(F27): NtRTIs e NNRTIs, TARV 1 (F28): NtRTIs, NNRTIs e PIs e TARV 1 (F29): outras combinações.

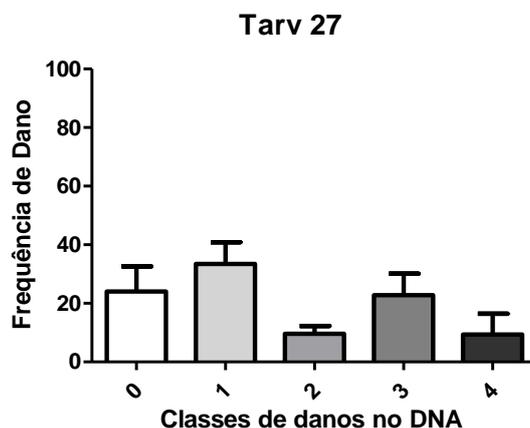


Figura 23. Frequência de danos em % (porcentagem) por classes de danos 0, 1, 2, 3 e 4 em usuários de NtRTIs e NNRTIs.

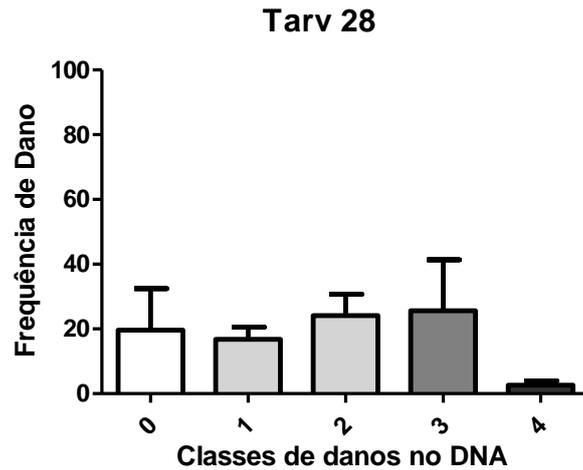


Figura 24. Frequência de danos em % (porcentagem) por classes de dano 0, 1, 2, 3 e 4 em usuários de NtRTIs, NNRTIs e PIs.

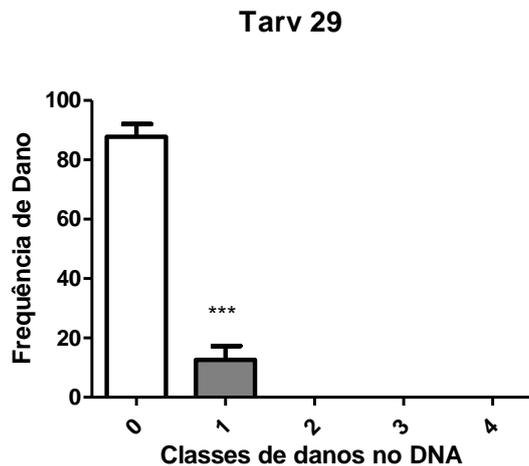


Figura 25. Frequência de danos em % (porcentagem) por classes de dano 0, 1, 2, 3 e 4 em usuários de outras combinações de HAART.

A análise das frequências de dano quando associado às classes de dano nos usuários de HAART, *naive* e entre os grupos conforme esquemas de TARV demonstraram que a classe de dano 3 é prevalente entre os pacientes que não iniciaram os antirretrovirais e que, após uso regular, as classes 0 e 1 predominam.

Analisou-se a frequência de danos entre as classes de danos conforme esquema de TARV (Fig. 26). Destacou-se na classe 0 (zero) a frequência de dano maior (87,8%)

entre os usuários de TARV 29. Na classe 1, a TARV 27 apresentou a maior frequência de dano (33,3%). A classe 2 apresentou frequências de danos dos usuários de TARV 27, 28 e *naive* mais baixas quando comparadas as classes 0, 1 e 3. No entanto, a classe de dano 4 demonstrou ter as menores frequências de dano (TARV 27 e 28), incluindo os pacientes não usuários de TARV. Em oposição, a maior frequência de dano entre os *naive* foi encontrada na classe 3, assim como nos usuários de TARV 28. Nos pacientes usuários de TARV 29, não se encontrou classes de danos 2, 3 e 4.

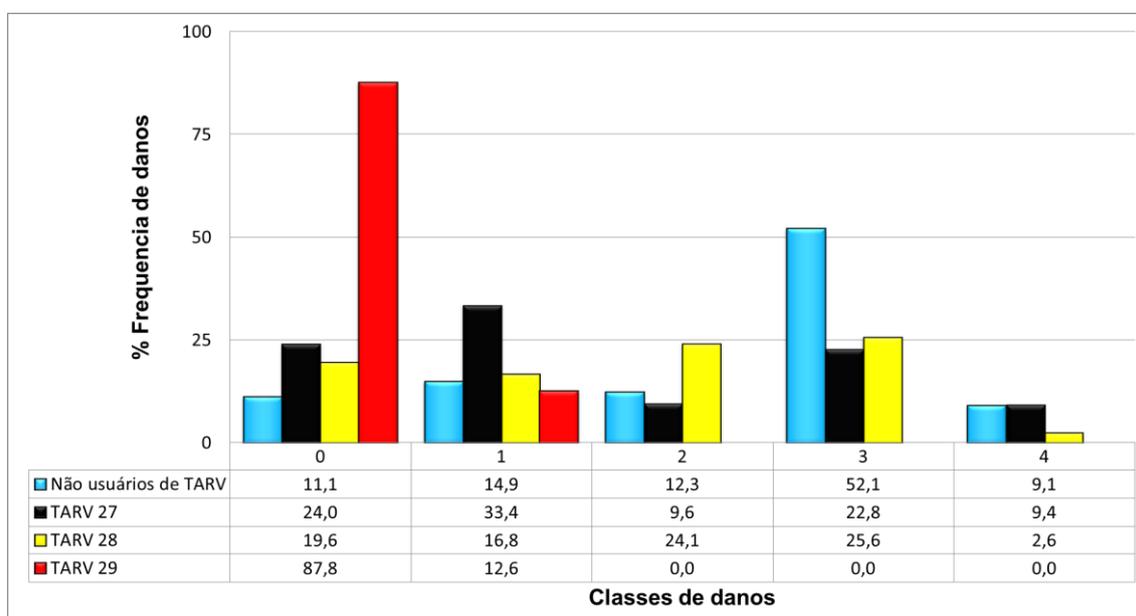


Figura 26. Frequências de danos por classes de danos e uso ou não de TARV. Os esquemas de TARV F27(NtRTIs e NNRTIs), TARV F28(NtRTIs, NNRTIs e PIs) e TARV F29(outras combinações) entre as classes de dano e suas maiores porcentagens de dano.

Em relação ao espermograma, não foi encontrado correlação estatisticamente significativa entre os elementos testados. No entanto, ressalta-se que 43 pacientes tiveram morfologia espermática anormal, ou seja, 86% da amostra total. Não se pode

afirmar que esse comportamento se repita em uma amostra maior, pois os estudos que avaliaram as características seminais de pacientes com HIV com e sem uso de HAART não tiveram resultados semelhantes.

5. DISCUSSÃO

O HIV é uma grave, mas controlável, doença crônica que afeta, na sua maioria, pessoas em idade reprodutiva. Muitas dessas pessoas possuem o desejo de ter filhos biológicos. Os tratamentos atuais para o HIV podem diminuir o risco de transmissão viral tanto pela via sexual quanto a vertical. Estudos recentes mostram que, em mulheres infectadas pelo HIV, o uso da terapia antirretroviral e ausência de aleitamento materno reduz a chance de infecção ao recém-nascido em cerca de 2%. Em 1994, o Comitê de Ética *American Society for Reproductive Medicine* (ASRM) estabeleceu diretrizes éticas aos pacientes com HIV que podem solicitar ou precisar de reprodução assistida. Especialmente, aos casais sorodiscordantes, cujo homem é portador de HIV. Por outro lado, a concepção natural com risco negligenciável de transmissão do HIV pode ser alcançada em casais sorodiscordantes com início precoce de HAART no parceiro HIV positivo (CDC, 2006). É fundamental ao médico avaliar as intenções de casais sorodiscordantes ao HIV em relação aos meios mais seguros para a concepção. Antes da opção natural, pode ser oferecida uma avaliação básica da fertilidade para identificar casais que são mais propensos a conceber com esta abordagem. A reprodução assistida em casais sorodiscordantes pode ter um impacto significativo na prevenção da transmissão viral. No caso do parceiro ser HIV positivo, a parceira tem a chance de 0,1-0,2% de adquirir o HIV por relação sexual desprotegida (Mastro & Vincenzi 1996), e tentar engravidar naturalmente acarreta um risco grave para a mulher não infectada e para a criança (Mandelbrot *et al.* 1997).

Os primeiros estudos na África Subsaariana mostrou que a fertilidade foi de 25% para 40% menor em mulheres infectadas do que entre os controles não infectados. Esta foi a primeira sugestão de que a AIDS poderia estar associada com infertilidade. No

entanto, o estado geral de saúde do paciente e, particularmente, aqueles com HIV/AIDS, pode variar consideravelmente, dependendo das condições socioeconômicas (Massad *et al.* 2004; Zaba *et al.* 1998).

A utilização de antirretroviral tem sido associada com uma menor probabilidade de concepção em um estudo prospectivo de coorte, realizado recentemente em seis Centros de Fertilização Norte Americanos. No entanto, outro estudo, realizado em sete Países Africanos com 4.531 mulheres infectadas pelo HIV, teve uma taxa de gravidez significativamente maior entre aqueles que recebem terapia antirretroviral (9,0 por 100 pessoas-ano em comparação com 6,5 por 100 pessoas-ano entre aqueles que não estavam em HAART) (Myer *et al.* 2010; Massad *et al.* 2004).

Os estudos sobre a capacidade de fertilização de espermatozóides de homens soropositivos para o HIV mostram resultados conflitantes por razões que ainda não estão claras. Estudos anteriores mostram que a infecção pelo HIV pode reduzir diretamente a qualidade do sêmen, incluindo o volume de sêmen, a concentração espermática, vitalidade, a mobilidade e a morfologia (Crittenden *et al.* 1992; Dondero *et al.* 1996; Lasheeb *et al.* 1997). No entanto, outros estudos relatam nenhuma alteração significativa de parâmetros de sêmen em homens soropositivos para o HIV (Bujan *et al.*; 2007; Nicopoullou *et al.* 2004; Muller *et al.* 1998).

O presente estudo avaliou espermograma e a genotoxicidade espermática de pacientes que convivem com o HIV em uso ou não de terapia antirretroviral por meio do Ensaio Cometa alcalino e da avaliação seminal conforme a OMS.

Em relação ao espermograma não se encontrou diferença estatisticamente significativa quando associado ao Índice e a Frequência de Dano da amostra.

Encontrou-se como ponto em destaque, na maioria dos pacientes, a morfologia dos espermatozoides alteradas (86%). Esse fato não foi associável com níveis de Linfócitos TCD4+ e carga viral. A média de idade foi menor de 50 anos, sendo, portanto, possível inferir que a idade não foi fator isolado para essa alteração morfológica já que não foi encontrado nenhum resultado estatisticamente significativo. Aproximadamente 50% dos pacientes tiveram volume seminal alterado. Esse dado foi semelhante em outros estudos, como o de Wang *et al.* (2014) e Nicopoullou *et al.* (2004). Provavelmente, como nos estudos citados, o número amostral foi o limitante para resultados reprodutíveis.

Em relação à genotoxicidade dos espermatozoides, o presente estudo avaliou o grupo com HIV positivo, tendo como diferença o uso de HAART ou ser *naive*. Como grupo controle, utilizou-se um trabalho realizado na região serrana do Rio Grande do Sul/Brasil por Pasqualotto *et al.*(2010),que permitiu definir a média do Índice de Dano em amostra seminal fresca de pacientes férteis e inférteis da mesma área geográfica do atual estudo. No estudo citado, o grupo controle com uma amostra de 20 pacientes, sendo 10 férteis e 10 inférteis, teve as médias de Índices de Dano de 64.90 e 115.10, respectivamente. O resultado encontrado em pacientes HIV foi 155,69 para o Índice de Dano e 70,9% para a Frequência de Dano. Outros estudos (fig. 26) também avaliaram o Índice de Dano, mas em pacientes não portadores de HIV, tendo sido obtidos resultados inferiores.

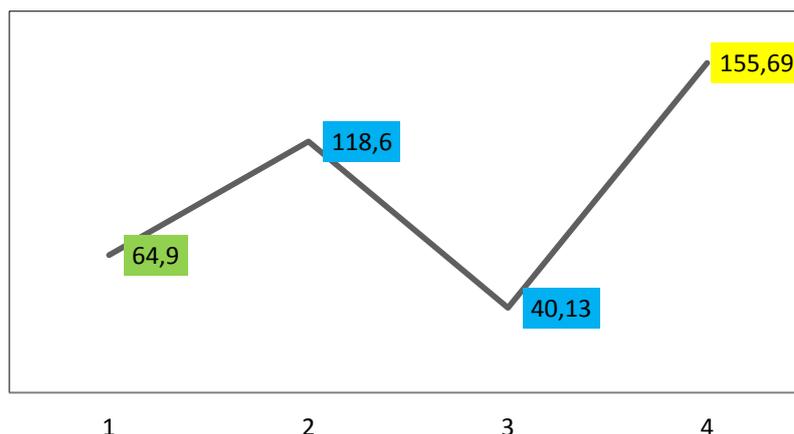


Figura 27. Índice de dano (número absoluto) entre diferentes estudos: 1 (Pasqualotto *et al.* 2010), 2 (Duty *et al.* 2002), 3 (Ribas-Maynou *et al.*, 2013) e 4

Observou-se, desse modo, que ter HIV e estar usando ou não terapia antirretroviral proporciona um Índice de Dano acima das apresentadas como, por exemplo, o índice de 64,9. Observou-se índice de dano significativamente elevados nos grupos que apresentam HIV e não utilizam TARV quando comparados ao grupo 1, com índice de dano 64,9 (Fig. 27).

Em relação aos hábitos de vida, a figura entre Frequência de Dano sugere que a o tabagismo, o etilismo e a drogadição aumentam a genotoxicidade, mas não teve $P < 0,05$.

Todas as variáveis analisadas convergiram para reforçar que o uso de terapia antirretroviral reduz a genotoxicidade espermática independente da classe do antirretroviral. Aparentemente, os nucleosídeos e os não nucleosídeos têm um potencial menor nessa redução. Esse fato pode estar relacionado à penetração dos fármacos supracitados nos tecidos responsáveis pela espermatogênese. O estudo de Louis Bujan *et al.* (2006) avaliou os parâmetros seminais de pacientes portadores de HIV na sua

maioria em tratamento e verificou que o volume seminal e a motilidade estão diminuídas. Questionou, entretanto, que não pode concluir se esse efeito é devido à carga viral ou ao efeito farmacológico do antirretroviral. Estudos também em animais avaliaram o grau de penetração e permanência dos antirretrovirais nos tecidos. Entre eles, há a discussão de que, nas gônadas masculinas, pode haver a multiplicação compartimentalizada do vírus da imunodeficiência humana, não tendo nenhuma relação com a sua multiplicação sérica (Matusali *et al.*, 2015; Pillai *et al.*, 2005). Esse fato permite inferir que as características genéticas virais podem ser diferentes nos tecidos humanos, especialmente em órgãos reprodutores. Todas essas diferenças podem influenciar no dano genético do espermatozóide (Frapsauce *et al.* 2015; DiFrancesco *et al.* 2013).

Duloust *et al.* (2002) observaram também redução do volume seminal e da motilidade. Como no estudo anterior, o trabalho realizado por Frapsauce *et al.* (2015) encontra redução na motilidade dos espermatozóides, mas questiona essa alteração como efeito adverso da terapia antirretroviral, em especial do Efavirenz neste último estudo.

Na avaliação do tempo de uso de terapia antirretroviral, demonstrou-se que quanto maior o tempo em dias de utilização HAART, menor é a genotoxicidade. Essa mesma correlação poder ser feita com a carga viral que é diretamente proporcional a frequência de dano. O esquema antirretroviral que demonstrou menor dano ao DNA foi o esquema menos utilizado nessa amostra.

Nos casos avaliados, evitar o uso de nucleosídeos e não nucleotídeos podem contribuir para menores quebras ao DNA. Entretanto, quando verificadas as classes de

dano, nota-se que o tipo 3 é o mais frequente entre os *naive*. Nos pacientes em tratamento, os danos apresentam-se em todos os seus níveis, sendo que o esquema que menos proporcionou danos foi o TARV 1 (F29), apesar de o grupo ser pequeno. Não há estudo com pacientes HIV que demonstrem essas análises. Todavia, o estudo de Paqualotto et al. (2006) apresentou, no grupo dos pacientes férteis, a classe de dano zero em sua maioria, sendo que os demais em ordem crescente aconteceram em proporções menores subsequentemente. No grupo de pacientes inférteis, detectou-se a classe de dano 1 em maior proporção, depois nenhum dano como segundo mais frequente. Diferentemente, nos pacientes em uso de nucleosídeos e não nucleotídeos, os tipos de dano 1 e 3 foram mais frequentes, seguidos daqueles com nenhum dano.

Esses resultados sugerem que, apesar de não serem encontradas alterações significativas nas variáveis do espermograma quando associadas com o Ensaio Cometa Alcalino, existe dano no material genético desses espermatozoides. Essa situação pode interferir na fertilidade desses pacientes, impossibilitando, talvez, a concepção por meios naturais, tendo em vista que o número de relações seria suficiente para possibilitar a transmissão do vírus mesmo com carga viral menor que o limite de detecção.

Na avaliação das classes de danos em usuários de TARV e naqueles *naive*, notou-se que nos usuários de TARV os danos 2, 3 e 4 foram menores do que nos não usuários. Essa diferença foi estatisticamente significativa. Em comparação aos dados de Paqualotto et al. (2006), há resultados diferentes, sendo que nos homens férteis as classes de danos predominantes foram os 0 e 1. Nos homens inférteis, aumentou a proporção de classes de dano 1, 2, 3 e 4 com predomínio da classe 2.

Em análise das classes de dano quando comparado com os diferentes esquemas de HAART, notou-se que a classe 2 foi prevalente no esquema TARV 1 (F27), a classe 3 no esquema TARV 1 (F28) e a classe 0 no TARV 1 (F29), sendo que encontrou-se nesse grupo a frequência de dano 1 bem abaixo da classe 0, sendo estatisticamente significativo. Apesar de haver predominância de classes entre os grupos, a classe 3 foi estatisticamente significativa em relação às demais quando relacionados os *naive*, o que representa uma genotoxicidade elevada.

Portanto, o uso de HAART reduz as classes de danos 3 e 4 e aumenta as classes 0, 1 e não mudando a 2. Esse resultado é positivo, pois demonstra os benefícios do controle da carga viral, do uso de TARV ou de ambos na redução da genotoxicidade espermática desse grupo de pacientes.

6. CONCLUSÃO

A partir dos dados trabalhados, é possível mensurar a genotoxicidade espermática dos pacientes portadores do vírus da imunodeficiência adquirida por meio do Índice e Frequência de Dano ao DNA pelo método Ensaio Cometa Alcalino. Mesmo com resultados estatisticamente significativos, o número amostral foi um limitante para resultados mais expressivos. Especialmente, na análise dos parâmetros do espermograma. Na observação minuciosa dos dados, o aumento da amostra dos pacientes HIV *naive* e HIV em uso de TARV proporcionaria um maior detalhamento das variáveis próprias de cada grupo. Entre elas, a influência dos esquemas de antirretrovirais do dano ao DNA dos espermatozóides. Apesar das limitações do estudo, que ocorreram devido à coleta de sêmen estar intrinsicamente relacionada à intimidade e privacidade dos pacientes, e devido à mudança de estratégia do Ministério da Saúde para início de terapia antirretroviral, o objetivo principal foi atingido. Verificou-se que ter HIV predispõe o espermatozóide a ter tipo de dano elevado quando sem terapia antirretroviral, mas que o seu uso reduz essa prevalência, aumentando os tipos zero e 1. Portanto, a HAART é um fator redutor da genotoxicidade espermática avaliada pelo Ensaio Cometa Alcalino e não é possível associar aumento de genotoxicidade com alterações do espermograma. Dessa forma, esse método torna-se uma ferramenta útil no diagnóstico de infertilidade masculina de pacientes com HIV/AIDS.

7. BIBLIOGRAFIA

- Abbott: RealTime HIV-1. United States: Abbott [2015 Nov 30]. Acesso em: <https://www.abbottmolecular.com/products/realtime-hiv-1.html>.
- Aukrust, P.; F. Muller, A. M; Svardal, T; Ueland, R. K; Berge S. S. Froland (2003). Disturbed glutathione metabolism and decreased antioxidant levels in human immunodeficiency virus-infected patients during highly active antiretroviral therapy--potential immunomodulatory effects of antioxidants. **J. Infect. Dis.** 188(2): 232-238.
- Barros T.H. (2007). Estudo Epidemiológico e monitoramento de lamivudina (3TC) e Zidovudina (AZT) na terapêutica do HIV-1 em pacientes de Belém-PA e suas correlações com as funções hepática, renal e nutricional. **Dissertação de mestrado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários**. Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, Brasil.
- Becton and Dickinson Company. (2015) BD FACSCalibur Flow Cytometer The Automated Multicolor Flow Cytometry System [2015 Nov 30]. **Disponível em (on line)** https://www.bdbiosciences.com/documents/facscalibur_brochure.pdf
- Benchaib, M.; Lornage, J.; Mazoyer, C.; Lejeune, H.; Salle, B.; Francois Guerin, J. (2007). Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as a prognostic indicator of assisted reproductive technology outcome. **Fertil. Steril.** 87(1), 93-100.
- Blanco J. L.; Martinez-Picado J. (2012). HIV integrase inhibitors in ART-experienced patients. **CurrentOpinion in HIV & AIDS.** 7: 415.
- BRASIL. (2012). Boletim epidemiológico da comissão intergovernamental de HIV/AIDS da Reunião de Ministros da Saúde do Mercosul. Brasília, **Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde**, nº 1.
- BRASIL (2013). Boletim epidemiológico da comissão intergovernamental de HIV/AIDS da Reunião de Ministros da Saúde do Mercosul. Brasília, **Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde**, nº 1.
- BRASIL (2014). Boletim epidemiológico da comissão intergovernamental de HIV/AIDS da Reunião de Ministros da Saúde do Mercosul. Brasília, **Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde**, nº 1.
- Bujan, L.; Daudin, M.; Matsuda, T.; Righi, L.; Thauvin, L.; Berges, L.; Izopet, J.; Berrebi, A.; Massip, P.; Pasquier, C.; Pasquier, C. (2004). Factors of intermittent

- HIV-1 excretion in semen and efficiency of sperm processing in obtaining spermatozoa without HIV-1 genomes. **AIDS**, 18(5), 757-766.
- Bujan, L.; Sergerie, M.; Moinard, N.; Martinet, S.; Porte, L.; Massip, P.; Pasquier, C.; Daudin, M. (2007). Decreased semen volume and spermatozoa motility in HIV-1-infected patients under antiretroviral treatment. **J. Androl.** 28(3): 444-452.
- Collins, A. R. (2009). Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. **Mutat. Res.** 681(1), 24-32.
- Cordeiro I.D., Baccarini R., Possas C. (2010). Adesão no Contexto da Terapia Antirretroviral no Brasil: Políticas Públicas e Desafios. In: Guimarães, Mark Drew Crosland (Org.). Adesão ao tratamento antirretroviral no Brasil: coletânea de estudos do projeto atar. **Brasília, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais.** p. 11-1
- Craigie, R. (2011). Integrase mechanism and function. In: Neamati, Nouri and Wang Binghe (Org.). HIV-1 Integrase: **Mechanism and Inhibitor Design.** New Jersey: Wiley.
- Christeff, N., S. Gharakhanian, N. Thobie, W. Rozenbaum and E. A. Nunez (1992). Evidence for changes in adrenal and testicular steroids during HIV infection. **J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.** 5(8): 841-846.
- Crittenden, J. A.; Handelsman, D. J.; Stewart, G. J. (1992). Semen analysis in human immunodeficiency virus infection. **Fertil. Steril.** 57(6), 1294-1299.
- Cooper, T. G.; Noonan, E.; von Eckardstein, S.; Auger, J.; Baker, H. W.; Behre, H. M.; Behre, H. M.; Haugen, T. B.; Kruger, T.; Wang, C.; Mbizvo, M. T.; Vogelsong, K. M. (2010). World Health Organization reference values for human semen characteristics. **Hum. Reprod. Update.** 16(3): 231-245.
- Cunico W.; Gomes C.R.B.; Junior, W.T.V. (2008). HIV – Recentes Avanços na Pesquisa de Fármacos. **Quim. Nova.** 32 (8): 2111- 2117.
- Deresz L. F., E. Sprinz, A. S. Kramer, G. Cunha, A. R. de Oliveira, H. Sporleder, D. R. de Freitas, A. R. Lazzarotto and P. Dall'Ago (2010). Regulation of oxidative stress in response to acute aerobic and resistance exercise in HIV-infected subjects: a case-control study. **AIDS. Care.** 22(11): 1410-1417.

- DiFrancesco, R., Tooley, K., Rosenkranz, S. L., Siminski, S., Taylor, C. R., Pande, P., & Morse, G. D. (2013). Clinical pharmacology quality assurance for HIV and related infectious diseases research. **Clin Pharmacol Ther**, 93(6), 479-482.
- Dondero, F., Rossi, T., D'Offizi, G., Mazzilli, F., Rosso, R., Sarandrea, N., Pinter, E. Aiuti, F. (1996). Semen analysis in HIV seropositive men and in subjects at high risk for HIV infection. **Hum. Reprod.** 11(4), 765-768.
- Dulioust, E., A. L. Du, D. Costagliola, J. Guibert, J. M. Kunstmann, I. Heard, J. C. Juillard, D. Salmon, M. Leruez-Ville, L. Mandelbrot, C. Rouzioux, D. Sicard, J. R. Zorn, P. Jouannet and M. De Almeida (2002). Semen alterations in HIV-1 infected men. **Hum. Reprod.** 17(8): 2112-2118.
- Duty, S. M., Singh, N. P., Ryan, L., Chen, Z., Lewis, C., Huang, T., & Hauser, R. (2002). Reliability of the comet assay in cryopreserved human sperm. **Hum Reprod**, 17(5), 1274-1280.
- Enciso, M.; Muriel, L.; Fernandez, J. L.; Goyanes, V.; Segrelles, E.; Marcos, M.; Montejo, J. M.; Ardoy, M.; Pacheco, A.; Gosalvez, J. (2006). Infertile men with varicocele show a high relative proportion of sperm cells with intense nuclear damage level, evidenced by the sperm chromatin dispersion test. **J. Androl.** 27(1), 106-111.
- Esteves, S. C.; Miyaoka, R; Agarwal, A. (2011). Sperm retrieval techniques for assisted reproduction. **Int. Braz. J. Urol.** 37(5): 570-583.
- Ethics Committee of the American Fertility Society. (2015). Ethical considerations of assisted reproductive technologies. **Fertil. Steril.** 62(Suppl 1):85s
- Fathi Najafi, T.; Latifnejad Roudsari, R.; Namvar, F.; Ghavami Ghanbarabadi, V.; Hadizadeh Talasaz, Z.; Esmaeli, M. (2015). Air pollution and quality of sperm: a meta-analysis. **Iran. Red. Crescent. Med. J.** 17(4): e26930.
- Feng, J. Y., A. A. Johnson, K. A. Johnson and K. S. Anderson (2001). Insights into the molecular mechanism of mitochondrial toxicity by AIDS drugs. **J. Biol. Chem.** 276(26): 23832-23837.
- Frapsauce, C., Grabar, S., Leruez-Ville, M., Launay, O., Sogni, P., Gayet, V., . . . Dulioust, E. (2015). Impaired sperm motility in HIV-infected men: an unexpected adverse effect of efavirenz? **Hum Reprod**, 30(8), 1797-1806.

- Gerschenson M., Poirier M.C., (2000). Fetal patas monkeys sustain mitochondrial toxicity as a result of in utero zidovudine exposure. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 918:269–81.
- Guimarães, NN (2013). Estudo tóxico genético de combinações de antirretrovirais inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos. **Tese Doutorado.** Universidade Federal de Goiás, Brasil.
- Hughes, C. M.; Lewis, S. E.; McKelvey-Martin, V. J.; Thompson, W. (1996). A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified comet assay. **Mol. Hum. Reprod.** 2(8), 613-619.
- Kakuda T.N. (2000) Pharmacology of nucleoside and nucleotide reverse transcriptase inhibitor-induced mitochondrial toxicity. **Clin. Ther.** 22: 685–708.
- Kohler, J. J. and W. Lewis (2007). A brief overview of mechanisms of mitochondrial toxicity from NRTIs. **Environ. Mol. Mutagen.** 48(3-4): 166-172.
- Krieger J.N.; Coombs R.W.; Collier A.C.; et al. (1991). Fertility Parameters in Men Infected with Human Immunodeficiency Virus. **J. Infect. Dis.** 164 (3): 464-469.
- Kushnir, V. A. and W. Lewis (2011). Human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome and infertility: emerging problems in the era of highly active antiretrovirals. **Fertil. Steril.** 96(3): 546-553.
- Leruez-Ville, M., E. Dulioust, D. Costabliola, D. Salmon, A. Tachet, L. Finkielsztejn, M. De Almeida, B. Silbermann, D. Sicard, P. Jouannet and C. Rouzioux (2002). Decrease in HIV-1 seminal shedding in men receiving highly active antiretroviral therapy: an 18 month longitudinal study (ANRS EP012). **AIDS** 16(3): 486-488.
- Lasheeb, A. S., King, J., Ball, J. K., Curran, R., Barratt, C. L., Afnan, M., & Pillay, D. (1997). Semen characteristics in HIV-1 positive men and the effect of semen washing. **Genitourin. Med.** 73(4), 303-305.
- Lewis, W., W. C. Copeland and B. J. Day (2001). Mitochondrial dna depletion, oxidative stress, and mutation: mechanisms of dysfunction from nucleoside reverse transcriptase inhibitors. **Lab. Invest.** 81(6): 777-790.
- Liao, C., M. Wahab, J. Anderson and J. S. Coleman (2015). Reclaiming fertility awareness methods to inform timed intercourse for HIV serodiscordant couples attempting to conceive. **J Int. AIDS. Soc.** 18(1): 19447.

- Matusali, G.; Dereuddre-Bosquet, N.; Le Tortorec, A.; Moreau, M.; Satie, A. P.; Mahe, D.; Roumaud, P.; Bourry O.; Sylla, N.; Bernard-Stoecklin S.; Pruvost A.; R. Le Grand, R.; Dejucq-Rainsford, N. (2015). Detection of Simian Immunodeficiency Virus in Semen, Urethra, and Male Reproductive Organs during Efficient Highly Active Antiretroviral Therapy. **J. Virol.** 89(11): 5772-5787.
- Mandelbrot, L.; Heard, I.; Henrion-Geant, E.; Henrion, R. (1997). Natural conception in HIV-negative women with HIV-infected partners. **Lancet.** 349(9055), 850-851.
- Mastro, T. D. & de Vincenzi, I. (1996). Probabilities of sexual HIV-1 transmission. **AIDS, 10 Suppl A**, S75-82.
- Massad, L. S.; Springer, G.; Jacobson, L.; Watts, H.; Anastos, K.; Korn, A.; Cejtin, H.; Stek, A.; Young, M.; Schmidt, J.; Minkoff, H. (2004). Pregnancy rates and predictors of conception, miscarriage and abortion in US women with HIV. **AIDS.** 18(2), 281-286.
- MERCOSUL (2012) Boletim Epidemiológico da Comissão Intergovernamental de HIV/AIDS da Reunião de Ministros da Saúde do MERCOSUL. **Boletim MERCOSUL N.1**
- Moás L.C.; Vargas E.V.; Maksud I.; Britto R. HIV/AIDS and reproduction: an analysis of the legal perspectiv. **Cad. Pesqui.** vol.43 no.150 São Paulo Sept./Dec. 2013
- Melo, E.B.; Bruni A.T.; Ferreira, M.M.C; (2006). Inibidores da HIV-integrase: potencial abordagem farmacológica para tratamento da AIDS. **Quim. Nova.** 29 (3): 555-562.
- Mesquita, F. (2013). Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para manejo da Infecção pelo HIV em Adultos. Brasília, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais.
- Muller, C. H., Coombs, R. W., & Krieger, J. N. (1998). Effects of clinical stage and immunological status on semen analysis results in human immunodeficiency virus type 1-seropositive men. **Andrologia.** 30 *Suppl 1*, 15-22.
- Myer, L., R. J. Carter, M. Katyal, P. Toro, W. M. El-Sadr and E. J. Abrams (2010). Impact of antiretroviral therapy on incidence of pregnancy among HIV-infected women in Sub-Saharan Africa: a cohort study. **PLoS. Med.** 7(2): e1000229.
- Nicopoulos, J. D., P. A. Almeida, J. W. Ramsay and C. Gilling-Smith (2004). The effect of human immunodeficiency virus on sperm parameters and the outcome

- of intrauterine insemination following sperm washing. **Hum. Reprod.** 19(10): 2289-2297.
- Nicopoulos, J. D., P. Almeida, M. Vourliotis and C. Gilling-Smith (2011). A decade of the sperm-washing programme: correlation between markers of HIV and seminal parameters. **HIV Med.** 12(4): 195-201.
- Pasqualotto, F. F.; Borges, E. Jr.; Pasqualotto, E. B. (2009). Current concepts and future trends in male germ cell cryobanking. **Front. Biosci. (Elite Ed)** 1: 367-380.
- Paqualotto F.F.; Queiroz P.; Tanil C.T.; et al. (2009) Obtenção de gametas seguros por meio de associação de técnicas de processamento seminal para casais sorodiscordantes para HIV. **FEMINA.** 37 (5): 277-282.
- Peçanha E.P. e Antunes O.A.C. (2002). Estratégias Farmacológicas para terapia anti-AIDS. **Quim.Nova.** 25 (6B): 1108-1116.
- Pereira, M. C. P. (2014) Adesão à terapia antirretroviral e classes terapêuticas consensuais. **Dissertação de Mestrado.** Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora.
- Pillai, S. K., Kosakovsky Pond, S. L., Woelk, C. H., Richman, D. D., & Smith, D. M. (2005). Codon volatility does not reflect selective pressure on the HIV-1 genome. **Virology**, 336(2), 137-143.
- Piot P. and T. C. Quinn (2013). Response to the AIDS pandemic--a global health model. **N. Engl. J. Med.** 368(23): 2210-2218.
- Politch J.A., Mayer K.H., Abbott A.F., et al. (1994). The effects of disease progression and zidovudine therapy on semen quality in human immunodeficiency virus type 1 seropositive men. **Fertil. Steril.** 61:922-928.
- Ramzan, M. H.; Ramzan, M.; Khan, M. M.; Ramzan, F.; Wahab, F.; Khan, M. A.; Jillani, M.; Shah, M. (2015). Human semen quality and sperm DNA damage assessed by comet assay in clinical groups. **Turk. J. Med. Sci.** 45(3), 729-737.
- Rhoden, E.L. Urologia no consultório. Porto Alegre: **Artmed**; 2009. p. 470-80.
- Ribas-Maynou, J.; Fernandez-Encinas, A.; Garcia-Peiro, A.; Prada, E.; Abad, C.; Amengual, M. J.; Navarro, J.; Benet, J. (2014). Human semen cryopreservation: a sperm DNA fragmentation study with alkaline and neutral Comet assay. **Andrology.** 2(1), 83-87.
- Ribas-Maynou, J.; Garcia-Peiro, A.; Fernandez-Encinas, A.; Abad, C.; Amengual, M.; J., Prada, E.; Navarro, J.; Benet, J. (2013). Comprehensive analysis of sperm

- DNA fragmentation by five different assays: TUNEL assay, SCSA, SCD test and alkaline and neutral Comet assay. **Andrology**. 1(5), 715-722.
- Sakkas, D., Seli, E.; Manicardi, G. C.; Nijs, M.; Ombelet, W.; & Bizzaro, D. (2004). The presence of abnormal spermatozoa in the ejaculate: did apoptosis fail? **Hum. Fertil (Camb)**. 7(2), 99-103.
- Simon, L.; G. Brunborg, M.; Stevenson, D.; Lutton, J.; McManus and S. E. Lewis (2010). Clinical significance of sperm DNA damage in assisted reproduction outcome. **Hum. Reprod**. 25(7): 1594-1608.
- Speit, G.; Vasquez, M.; Hartmann, A. (2009). The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity. **Mutat. Res**. 681(1), 3-12.
- Tindall, B.; Forde, S.; Goldstein, D.; M. W. Ross, M.W.; Cooper D.A.; (1994). Sexual dysfunction in advanced HIV disease. **AIDS Care**. 6(1): 105-107.
- Tug, N.; Sandal, S.; Ozelgun, B.; Yilmaz, B. (2011). Correlation of spermogram profiles with DNA damage in sperm cells of infertile men: a comet assay study. **Gynecol. Endocrinol**. 27(1), 49-54.
- Ulrich A., MCCOMSEY, Gracey A (2007) Análogos nucleosídeos e toxicidade mitocondrial. Disponível em: http://hivmedicines.aidsportugal.com/html/08_Mitotox.html.
- Vargas L.P., Maksud I., Moás L.C. et al. (2010). HIV/Aids, direitos reprodutivos e tecnologias reprodutivas: mapeando diferentes perspectivas. **RECIIS**. 4 (4): 94 – 103.
- Veras, MASM. (2011). Projeto cooperativo AMA-Brasil: um estudo nacional do perfil clínico e epidemiológico dos óbitos relacionados à AIDS na era da terapia antirretroviral. **Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro**. 27 (1):104-113.
- Vasquez, M. Z. (2012). Recommendations for safety testing with the in vivo comet assay. **Mutat. Res**. 747(1), 142-156.
- Walker, D. M., A. E. Kajon, S. M. Torres, M. M. Carter, C. L. McCash, J. A. Swenberg, P. B. Upton, A. W. Hardy, O. A. Olivero, G. M. Shearer, M. C. Poirier and V. E. Walker (2009). WR1065 mitigates AZT-ddI-induced mutagenesis and inhibits viral replication. **Environ. Mol. Mutagen**. 50(6): 460-472.
- Walker, V. E. and M. C. Poirier (2007). "Special issue on health risks of perinatal exposure to nucleoside reverse transcriptase inhibitors." Environ Mol Mutagen 48(3-4): 159-165.

- World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research (2010)
WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen.
W.H.O. Fifth edition
- Yudin, M. H.; Shapiro H. M.; Loutfy M;R. (2010). Access to infertility services in
Canada for HIV-positive individuals and couples: a cross-sectional study.
Reprod. Health. 7: 7.
- Zaba, B., & Gregson, S. (1998). Measuring the impact of HIV on fertility in Africa.
AIDS, **12 Suppl 1**. S41-50.
- Zini, A.; Bielecki, R.; Phang, D.; Zenzes, M. T. (2001). Correlations between two
markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in
fertile and infertile men. **Fertil. Steril.** 75(4), 674-677.

ANEXOS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

ESTUDO: HIV/AIDS e infertilidade masculina: genotoxicidade espermática em usuários de Terapia Antirretroviral de Alta Potência.

Você está sendo convidado (a) a participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós, mas se desistir a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você.

Eu, _____

_____, _____, residente e domiciliado

em _____, portador

da Cédula de identidade(RG) _____, e inscrito

no CPF/MF _____ nascido(a)

em ____ / ____ / _____, abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea

vontade em participar como voluntário do estudo ***HIV/AIDS e infertilidade masculina: genotoxicidade espermática em usuários de Terapia Antirretroviral de Alta Potência.***

Declaro que obtive todas as informações necessárias, bem como todos os eventuais esclarecimentos quanto às dúvidas por mim apresentadas.

Estou ciente que:

I) O estudo se faz necessário para que se possam descobrir as possíveis causas associadas à infertilidade masculina (incapacidade de ter filhos) de pacientes soropositivos em uso de coquetel, comparando com os soropositivos que ainda não tomam o coquetel;

II) Será feita, para o estudo explicado acima, coleta do meu sêmen por meio de automasturbação em data e local agendados **com necessidade de abstinência sexual de pelo menos dois dias** conforme regulamentos da Vigilância Sanitária;

III) Autorizo coleta de informações do meu histórico médico registradas em prontuário vinculado ao atendimento da doença de base do estudo acima explicado (HIV/AIDS);

IV) A minha privacidade será em todas as etapas do estudo preservada, especialmente durante a coleta da amostra, assim como MANTIDO o SIGILO referente ao meu histórico médico (DOENÇAS QUE POSSUO);

V) A participação neste projeto não tem objetivo de me submeter a um tratamento, bem como não me acarretará qualquer despesa financeira, relacionada aos procedimentos médico-clínico-terapêuticos efetuados no estudo;

VI) Tenho a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;

VII) A desistência não causará nenhum prejuízo à minha saúde ou bem estar físico. Não virá interferir no atendimento ou tratamento médico;

VIII) Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados;

IX) Caso eu desejar, poderei pessoalmente tomar conhecimento dos resultados, ao final desta pesquisa.

Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

X) Concordo que o material coletado (sêmen) possa ser inutilizado (descartado) ao final da pesquisa ou utilizado em outros projetos desde que autorizado pela Comissão de Ética e pelo responsável por esta pesquisa. Caso minha manifestação seja positiva, poderei retirar essa autorização a qualquer momento sem qualquer prejuízo para mim;

Sim ou Não

XI) Poderei contatar o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital do Círculo no fone (54) 3013-9106 ou no e-mail: livia.severo@circulosaude.com.br ou ainda com Viviane Raquel Buffon no e-mail buffonviviane@gmail.com para recursos ou reclamações em relação ao presente estudo;

XII) O sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE - apondo sua assinatura na última página do referido Termo;

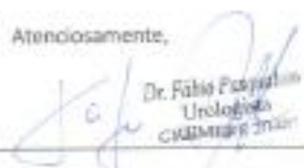
XIII) O pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE– apondo sua assinatura na última página do referido Termo;

Caxias do Sul, 16 de Junho de 2014

Ao CEP do Circulo Operário Caxiense, Faculdade da Serra Gaúcha

Venho, por meio desta, autorizar o Conception como laboratório de coleta, a utilização de amostras de sêmen para uso em pesquisa realizada pela Dra Viviane Buffon,

Atenciosamente,



Dr. Fábio Firmbach Pasqualotto
Urologista
CRM-RS 20407

Fábio Firmbach Pasqualotto

Diretor CONCEPTION – Centro de Reprodução Humana

CRM 20407

FR – PEPS – 06.04

Página: 1 de 1

Revisão: 00/2012

Data da emissão: 01/10/2012

12/06/2014

Prezado(a) Senhor(a), Dr. Fabio Pasqualotto, Dr. João Antonio Pegas Henriques, Drª. Lessandra Michellin, Prof. Viviane Raquel Buffon.

Vimos, por meio deste, comunicá-lo (a) que, o Conselho Científico e Editorial do Hospital Geral (HG) de Caxias do Sul avaliou o projeto de sua autoria: "HIV/AIDS infertilidade masculina: genotoxicidade espermática em usuários de Terapia Antirretroviral de Alta Potência." e emitiu o seguinte parecer, levando em consideração a viabilidade de realização, interesse científico e relevância do mesmo para o HG/AMCE:

Aprovado	<input checked="" type="checkbox"/>
Aprovado com pendências	<input type="checkbox"/>
Não aprovado	<input type="checkbox"/>

Comentários:

Igualmente, aproveitamos para informá-lo (a) que após a aprovação do projeto pelo COEDI, ele deve ser encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) para análise dos aspectos éticos. Após a aprovação pelo CEP, o pesquisador (a) deverá entregar uma cópia desta aprovação ao COEDI. Somente depois deste procedimento, poderá dar início à pesquisa no HG/AMCE.

Ao final da pesquisa, o pesquisador (a) deverá encaminhar ao COEDI um resumo dos resultados da pesquisa ou cópia da publicação.

Sem mais,

Atenciosamente,

Prof. Patrônio Fagundes de Oliveira Filho

Presidente do COEDI

Não se esqueça de encaminhar seu projeto ao CEP

Caxias do Sul, 16 de junho de 2014.

Comitê de Ética em Pesquisa
Círculo Operário Caxiense – Faculdade da Serra Gaúcha
Profa. Alexandra Flávia Gazzoni
Coordenadora

Referente: Parecer CEP Nº 686.771

TERMO DE CONCORDÂNCIA

Declaro, pelo presente termo, que o Laboratório de Pesquisa em HIV/AIDS da Universidade de Caxias do Sul, tem ciência e concorda com a utilização de sua infraestrutura laboratorial para a realização da parte experimental da Dissertação de Mestrado da aluna Viviane Raquel Buffon.

A dissertação da aluna intitula-se: *HIV/AIDS e infertilidade masculina: genotoxicidade mitocondrial espermática em usuários de Terapia Antirretroviral de Alta Potência*.

Estamos à disposição para quaisquer esclarecimentos.

Atenciosamente,



Rosa Dea Sperhackle, PhD
Coordenadora do Laboratório de Pesquisa em HIV/AIDS



Estado do Rio Grande do Sul
Prefeitura Municipal de Caxias do Sul
Secretaria Municipal da Saúde

PARECER SOBRE SOLICITAÇÃO DE PROJETOS DE PESQUISA

Em relação ao pedido de realização da Pesquisa "HIV/AIDS E INFERTILIDADE MASCULINA: GENOTOXIDADE ESPERMÁTICA EM USUÁRIOS DE TERAPIA ANTIRRETROVIRAL DE ALTA POTÊNCIA" da pesquisadora, Viviane Raquel Buffon do Programa Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, conforme protocolo nº 327/14, esta Secretaria manifesta-se favorável à realização da mesma e autoriza a coleta de dados conforme prevista no Projeto, desde que o pesquisador cumpra os seguintes requisitos:

- Fornecimento de cópia da conclusão do trabalho a SMS;
- Inclusão do nome da Prefeitura Municipal de Caxias do Sul/SMS em possíveis publicações científicas;

Caxias do Sul, 08 de maio de 2014


Dilma Maria Tonoli Tessari
Secretária Municipal de Saúde

*Obs: ver observações anexo
Boip*

Assinatura do Pesquisador: _____

Data prevista para entrega do material: _____

HIV/AIDS e infertilidade masculina: genotoxicidade espermática em usuários de Terapia Antirretroviral de Alta Potência

Nome: _____

Idade: _____ Procedência: _____ Data: _____

QUESTIONÁRIO

DADOS DEMOGRÁFICOS

Raça	<input type="checkbox"/> Branca	<input type="checkbox"/> Parda	<input type="checkbox"/> Negra	<input type="checkbox"/> Amarela
Estado civil	<input type="checkbox"/> Solteiro	<input type="checkbox"/> Casado	<input type="checkbox"/> União estável	<input type="checkbox"/> Divorçado <input type="checkbox"/> Viúvo
Zona de moradia	<input type="checkbox"/> Rural	<input type="checkbox"/> Urbana		
	Se rural, tem contato com agrotóxicos?		<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
	Com que frequência? _____			
Opção sexual	<input type="checkbox"/> Heterossexual	<input type="checkbox"/> Homossexual	<input type="checkbox"/> Bissexual	
Tem filhos consanguíneos?	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não			
Profissão	_____			
	Tem contatos com solventes?		<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
Escolaridade	<input type="checkbox"/> Analfabeto	<input type="checkbox"/> Ensino fundamental Incompleto	<input type="checkbox"/> Ensino médio Incompleto	<input type="checkbox"/> Ensino superior Incompleto
	<input type="checkbox"/> Analfabeto funcional	<input type="checkbox"/> Ensino fundamental completo	<input type="checkbox"/> Ensino médio completo	<input type="checkbox"/> Ensino superior completo

HÁBITOS DE VIDA

Carga tabélica	maços/dia		X	anos		maço
Êtilismo	<input type="checkbox"/> Destilado	<input type="checkbox"/> Cerveja	<input type="checkbox"/> Vinhos	Dose/dia:		
Uso de drogas	<input type="checkbox"/> Maconha	<input type="checkbox"/> Cocaína	<input type="checkbox"/> Crack	<input type="checkbox"/> Outros		
	Uso diário:		Uso eventual:			
Alimentação	<input type="checkbox"/> Frutas	<input type="checkbox"/> Verduras	<input type="checkbox"/> Legumes	<input type="checkbox"/> Carne	<input type="checkbox"/> Ovos	<input type="checkbox"/> Soja
	Diariamente:		<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não		
			<input type="checkbox"/> Pelo menos uma unidade	<input type="checkbox"/> Mais de uma unidade ou de uma porção ou porção		
Ingestão de café	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	Dose por dia:			
Atividade física	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	Quantas vezes por semana?			

COMORBIDADES

Diabetes HAS Dislipidemia Depressão Hepatite C Hepatite B Tuberculose
 DPOC Impotência Obesidade Doenças do coração Doenças do cérebro
 (Qual?) (Qual?)
 Outras: _____

HIV

Quando descobriu ser portador? _____
 Já iniciou o coquetel? Sim Não
 Se sim, quando? _____
 Seu parceiro também é portador? Sim Não
 Seu parceiro faz tratamento para HIV? Sim Não
 Se casal heterossexual, pretendem ter filhos? Sim Não
 Se casal heterossexual, não quer ter filhos por quê? Idade HIV Não sabe Outros: _____

Assinatura _____

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: HIV/AIDS e Infertilidade masculina: genotoxicidade espermática em usuários de Terapia Antiretroviral de Alta Potência.

Pesquisador: VIVIANE RAQUEL BUFFON

Área Temática: Genética Humana;

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Reprodução Humana (pesquisas que se ocupam com o funcionamento do aparelho reprodutor, procriação e fatores que afetam a saúde reprodutiva de humanos, sendo que nessas pesquisas serão considerados "participantes da pesquisa" todos os que forem afetados pelos procedimentos delas);

(Reprodução Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 2

CAAE: 31036414.2.0000.5311

Instituição Proponente:

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

Fundação Universidade de Caxias do Sul - FUCS/RS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 728.576

Data da Relatoria: 07/07/2014

Apresentação do Projeto:

Adequado.

Objetivo da Pesquisa:

Adequado.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Adequado.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

As alterações sugeridas foram devidamente atendidas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequado.

Endereço: R. General Arcy da Rocha Nóbrega, 421

Bairro: Jardim Margarida

CEP: 95.040-350

UF: RS

Município: CAXIAS DO SUL

Telefone: (54)3013-0108

Fax: (54)3228-2445

E-mail: cep@circuloaude.com.br

**CÍRCULO OPERÁRIO
CAXIENSE - FACULDADE DA
SERRA GAÚCHA**



Continuação do Parecer: 731.676

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As alterações sugeridas foram devidamente atendidas.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Aprovação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto aprovado. Solicitamos que qualquer anormalidade durante o desenvolvimento da pesquisa seja informada a este Comitê.

CAXIAS DO SUL, 25 de Julho de 2014

**Assinado por:
Alexandra Flávia Gazzoni
(Coordenador)**

Endereço: R. General Arcy da Rocha Nóbrega, 421
Bairro: Jardim Margarida CEP: 95.040-200
UF: RS Município: CAXIAS DO SUL
Telefone: (54)3013-9106 Fax: (54)3026-2445 E-mail: cep@circuloaxuda.com.br

1. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 23, de 27 de maio de 2011.
2. Relatório GlobalVigésima Avaliação Externa da Qualidade Testes para Contagem de Linfócitos T CD4+/CD8+.
3. Relatório GlobalVigésima Avaliação Externa da Qualidade Testes de Carga Viral do HIV.