



Fundação Bahiana
para Desenvolvimento
das Ciências



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz



Escola Bahiana de
Medicina e Saúde Pública

**PREVALÊNCIA DE ALTERAÇÕES DOS NÍVEIS
PLASMÁTICOS DE OSTEOCALCINA EM INDIVÍDUOS
PORTADORES DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA
HUMANA TIPO 1**

Antonio Carlos Silva Santos Junior

Salvador - Bahia
2002

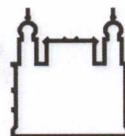




Fundação para
Desenvolvimento
das Ciências

Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

Ministério da Saúde



FIOCRUZ - BAHIA

Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz



Escola Bahiana de
Medicina e Saúde Pública

PREVALÊNCIA DE ALTERAÇÕES DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE OSTEOCALCINA EM INDIVÍDUOS PORTADORES DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA TIPO 1.

Dissertação apresentada ao Colegiado do Curso de Pós-Graduação da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública da Fundação para o Desenvolvimento das Ciências, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina Interna.

Autor:

Antonio Carlos Silva Santos Junior

Professor orientador:

Bernardo Galvão Castro Filho

Salvador - Bahia
2002

CPqGM
Biblioteca
Reg.: 2452

Pós-graduação em Medicina Interna

Mestrado e Doutorado

- **F.D.C – Fundação para o Desenvolvimento das Ciências**
Prof. Dr. Humberto de Castro Lima (Coordenador Geral)
- **FIOCRUZ-Bahia – Fundação Oswaldo Cruz – Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz**
Paulo Buss – Presidente
- **EBMSP – Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública**
Profa. Maria Luisa Carvalho Soliani – Diretora
- **Pós-Graduação e Extensão**
Profa. Maria Luisa Carvalho Soliani – Coordenadora
- **Pós-Graduação em Medicina Interna**
Prof. Dr Carlos Alfredo Marcílio de Souza - Coordenador
- **Pós-Graduação em Medicina Interna**
Prof. Dr. Bernardo Galvão Castro Filho – Vice-coordenador

Corpo Docente	
Carlos Alfredo Marcílio de Souza	Bernardo Gaivão Castro Filho
Lucíola Maria Lopes Crisóstomo	Miriam Marcílio Rabelo
Antonio Andrade	Washington L. C. dos Santos
Raymundo Paraná Filho	Lain Pontes de Carvalho
Mittermayer Gaivão Reis	Sergio Marcos Arruda

Ficha Catalográfica

S237 Santos Junior, Antonio Carlos Silva

Prevalência de alterações dos níveis plasmáticos de osteocalcina em indivíduos portadores do vírus da imunodeficiência humana Tipo I./ Antonio Carlos Silva Santos Jr. – Salvador, 2002.

viii, 89 p.

Dissertação de mestrado em Medicina Interna. Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública. Fundação para Desenvolvimento das Ciências.

1. HIV-1. 2. Osteocalcina. 3. Metabolismo Ósseo.
I. Escola Baiana de Medicina e Saúde Pública II. Castro Filho, Bernardo Galvão. III. Título

CDU.: 616.98.578.828

L12DB1

616.98.578.828
S237 p

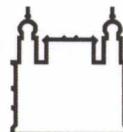
P.12
11/10/2002
003222



Fundação para
Desenvolvimento
das Ciências

Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

Ministério da Saúde



FIOCRUZ - BAHIA

Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz



Escola Bahiana de
Medicina e Saúde Pública

Folha de Aprovação

PREVALÊNCIA DE ALTERAÇÕES DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE OSTEOCALCINA EM INDIVÍDUOS PORTADORES DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA TIPO 1.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Carlos Brites

Professor Adjunto do Departamento de Medicina, Disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias, da Universidade Federal da Bahia

Prof^a. Dr^a. Maria Inês Costa Dourado

Professora Adjunta do Departamento de Saúde Coletiva, da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Washington Luís Conrado dos Santos

Doutor em Patologia
Pesquisador da Fundação Oswaldo Cruz

Salvador - Bahia

2002

"O esqueleto, longe de nossos olhos e de nosso coração, é uma massa formidável de tecido, ocupando cerca de 9% do corpo em volume e não menos do que 17% em peso. A estabilidade e imutabilidade de ossos secos e sua persistência através de séculos, e mesmo milhões de anos depois que os tecidos moles já se transformaram em pó, nos dão uma falsa idéia do osso durante a vida. Sua fixidez, após a morte, está em profundo contraste com sua incessante atividade na vida."

(Cooke, 1955)

*Trabalho realizado no Laboratório Avançado
de Saúde Pública do Centro de Pesquisas
Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz,
Bahia, sob a orientação do
Dr. Bernardo Galvão Castro Filho.*

A Deus por ter me permitido chegar até aqui.

*À minha mãe que com força e coragem nos ensinou que
com fé, determinação e ética podemos alcançar todos os
nossos objetivos.*

*A meu pai cuja memória permanece firme, guiando-me
na moral e na conduta.*

Ao meu tio Robson cujo apoio de pai é imprescindível.

*À minha esposa Cláudia e meus filhos
Caio e Daniel pelo amor e compreensão dispensados em
todos os momentos dessa
nossa caminhada.*

*À minha irmã Marlene e meu cunhado Adriano pelo
estímulo, conselhos e colaboração constantes.*

Agradecimentos

- Ao meu amigo e orientador Prof. Dr. Bernardo Galvão Castro Filho, pessoa que aprendi a admirar pela sapiência e humildade e que durante nossa convivência esteve sempre disponível e com uma palavra de incentivo, um especial reconhecimento e o desejo de prosseguirmos juntos nessa caminhada acadêmica.
- Ao amigo Prof. Dr. Fernando Glassner Araújo que disponibilizou seu Laboratório Qualitech para a realização de todos os testes necessários à execução do trabalho.
- Ao Prof. Dr. Carlos Alfredo Marcílio de Souza, pelos valiosos ensinamentos e empenho frente à coordenação da nossa Pós-Graduação.
- Ao Prof. Dr. Humberto de Castro Lima, coordenador geral da FDC, pelo acolhimento nesta instituição.
- À Profa. Dra. Maria Luiza Soliani, pelo trabalho e empenho para o sucesso desta Pós-Graduação.
- À Profa. Dra. Lucíola Maria Lopes Crisóstomo, incentivadora incansável, amiga e orientadora indispensável em todas as horas.
- À Bioquímica Viviana Olavarria, pelas horas investidas nos ensinamentos de imunologia e virologia, pela participação nas realizações dos testes laboratoriais e na escolha das amostras para estudo.
- À Bióloga Maralice Seabra, pela total colaboração durante as realizações dos testes no Laboratório Qualitech.

- Ao Prof. Dr. Carlos Maurício Cardeal Mendes, pelos preciosos ensinamentos e revisão completa da estatística.
- A Noilson Lázaro Souza Gonçalves, pelo apóio técnico no LASP.
- À Profa. Rosemeire Fiaccone, pela colaboração na análise estatística do estudo.
- À toda a família do LASP, pela amizade e acolhimento.
- Aos colegas da Pós-Graduação, pela amizade, estímulo e incentivo constante.
- À toda família da Pós-Graduação representada na pessoa da nossa querida Tereza Conceição Cardoso que tornou o ambiente de trabalho um local do qual não se deseja sair.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS E QUADROS	3
LISTA DE FIGURAS.....	4
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	4
RESUMO	8
ABSTRACT	10
INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Estrutura e Função do Osso.....	14
1.1.2 Organização macroscópica do Osso	14
1.1.2 Matriz óssea e mineral.	15
1.1.3 O Osteoblasto e a Formação do Osso.....	16
1.1.4 O Osteoclasto e a Reabsorção Óssea.....	17
1.1.5 Acoplando Formação e Reabsorção Óssea	18
1.1.6 Matriz Óssea	19
1.1.7 Colágeno.....	20
1.1.8 Proteínas Não Colagenosas	21
1.1.9 Fatores de crescimento da matriz óssea	24
1.1.10 Mediadores de Remodelação Óssea e Reparo	25
1.1.11 Controle Molecular do Remodelamento Ósseo	27
1.1.12 Osteocalcina	29
2 O Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 1.....	31
1.2.1 Morfologia e estrutura Genômica:	33
1.2.2 Resposta Imune Contra o HIV	35
1.2.3 A Replicação do HIV	40

1.2.4	Dinâmica do HIV no Organismo infectado	41
1.3	Linfócitos.....	42
1.4	Osteocalcina e HIV	44
2.	OBJETIVOS	46
2.1	Principal.....	46
2.2	Secundários	46
3.	CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS	47
3.1	Delineamento do estudo	47
3.2	Populações de Estudo	47
3.2.1	Casos	47
3.2.2	Crítérios de Inclusão	48
3.2.3	Crítério de Exclusão	48
3.2.4	Controles	49
3.3	Métodos Laboratoriais	50
3.3.1	Dosagem da osteocalcina	50
3.3.2	Contagem de Linfócitos CD4 ⁺	51
3.3.3	Determinação da Carga Viral Plasmática.	52
3.4	Análise Estatística	55
4.	RESULTADOS	57
5.	DISCUSSÃO	65
6.	CONCLUSÕES	70
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
	ANEXOS	82

Lista de Tabelas e Quadros

Quadro 1. Efeitos das citocinas na replicação do HIV38

Quadro 2. Os linfócitos e seus marcadores celulares específicos:43

Tabela 1. Dados demográficos, osteocalcina, CD4 e carga viral nos grupos estudados.60

Tabela 2. Comparação das distribuições das variáveis de estudo entre grupos.....60

Tabela 3. Prevalência, Razão de Chances e respectivos Intervalos de Confiança (95%) da redução dos níveis de osteocalcina entre os grupos de estudo.62

Lista de Figuras

- Figura 1** Imunomodulação do remodelamento ósseo; Retirado e adaptado de Stein, 1993.....29
- Figura 2** Estrutura da Osteocalcina; Retirado de: Delmas *et al.*, 1990.....31
- Figura 3** Representação esquemática da Estrutura do HIV; Fonte: Carga Viral, 199934
- Figura 4** Interação do HIV com células T CD4⁺; Retirado e adaptado de <http://medscape.com>40
- Figura 5** A REPLICAÇÃO DO HIV-1; Retirado e adaptado de <http://rkm.com.au>42

Lista de Siglas e Abreviaturas

Ag	Antígeno
BSP	Sialoproteína óssea
C1	Primeira região constante da gp120
C4	Quarta região constante da pg120
C5	Quinta região constante da pg120
CCR2b	Receptor para -quimiocinas
CCR3	Receptor para -quimiocinas
CCR5	Receptor para -quimiocinas
ccr5 Δ 32	Gene mutante para tradução da proteína defeituosa do CCR5
Cpms	Contagens por minuto
CRDS	Curdian Sulfato
CTL	Linfócitos T citotóxicos
CXCR4	Receptor de quimiocina
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DS	Dextran sulfato
DT	Isolado duplo trópico
EDTA	Etileno Diamino Tetracético
ELISA	Ensaio imunoenzimático
FDA	<i>Food drugs administration and prevention</i>
FITC	Fluoresceína isoticianato
gp120	Glicoproteína do envelope do HIV-1 de 120 Kb
gp41	Glicoproteína do envelope do HIV-1 de 41 Kb
HUPES	Hospital Universitário Professor Edgard Santos
Hepes	N[2-Hydroxietil] piperazina-N'[2-etanosulfônico]
HIV-1	Vírus da imunodeficiência humana tipo 1

HIV-2	Vírus da imunodeficiência humana tipo 2
HLA	<i>Human-leucocyte-associated antigens</i>
HTLV-I/II	Vírus linfotrófico de células T humanas tipos I e II
IL-2	Interleucina tipo 2
IS	Indutor de sincício
kb	Kilobases
Kd	Kilodaltons
LASP	Laboratório Avançado de Saúde Pública
Mab	Anticorpo monoclonal
MIP-1	<i>Macrophage inflammatory protein 1</i>
MIP-1	<i>Macrophage inflammatory protein 1</i>
ml	Mililitros
ng	Nanograma
NIS	Não indutor de sincício
nm	Nanômetro
OPG	Osteoprotegerina
p24	Proteína do nucleocapsídeo do HIV-1 de 24 kd
PBMC	Células Mononucleares do Sangue Periférico
PE	Phicoeritrina
R3	Isolado de HIV-1 que utiliza o receptor CCR3
R5	Isolado de HIV-1 que utiliza o receptor CCR5
R5X4	Isolado de HIV-1 capaz de utilizar simultaneamente os receptores CCR5 e CXCR4
RANTES	Regulated upon activation normal T-expressed and secreted
RANK	Receptor Ativador de Osteoprotegerina Ligante
RNA	Ácido Ribonucléico
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
sCD4	CD4 solúvel

SIDA/AIDS	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
TCLA	Vírus adaptado às condições de replicação em células tumorais T CD4 ⁺
TL	Trópico para células T ou linfotrópico
TM	Trópico para macrófagos ou Monocitotrópico
UI	Unidades Internacionais
V1	Primeira região variável da gp120 do envelope do HIV-1
V2	Segunda região constante da pg120
V3	Terceira região variável da gp120 do envelope do HIV-1
V5	Quinta região variável da gp120
X4	Isolado de HIV-1 que utiliza o receptor CXCR4
XTT	<i>2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulphenyl]-2-H-tetrazolium-5-carboxilanilide</i>

Resumo

Pacientes infectados pelo HIV apresentam alterações no metabolismo ósseo e mineral aparentemente relacionadas à infecção. Osteopenia tem sido associada à terapia com inibidores de protease. Porém, interação do HIV com células do esqueleto e da matriz óssea, assim como, ativação crônica de células T e produção anormal de citocinas podem afetar a função de osteoblastos e osteoclastos mesmo antes do uso de terapia. O objetivo deste estudo foi o de investigar a influência da infecção pelo HIV nos níveis séricos do marcador de formação óssea osteocalcina. Realizamos um estudo seccional no qual avaliamos 69 indivíduos portadores do HIV [48 homens, 21 mulheres, idade média / (sd): 33 anos \pm 4] antes do uso de terapia antiretroviral. Para fins de comparação, 50 indivíduos HIV negativos foram testados como controles. Com objetivo de analisar uma possível relação entre os níveis séricos de osteocalcina e a severidade da doença o grupo HIV + foi agrupado - de acordo com seus níveis de linfócitos T CD4 - em três grupos de 23 indivíduos: Grupo 1 CD4 \geq que 500, Grupo 2 CD4 entre 499 e 200 e Grupo 3 CD4 \leq que 199. Níveis de osteocalcina foram mensurados por um ensaio imunométrico (DPC Corp., Los Angeles, CA) detectando a fração intacta da osteocalcina (1-49) com valores de referência

variando de 3,1 a 13,7 ng/ml. Quando comparando mais de dois grupos, o teste de Kruskal-Wallis foi utilizado. Quando uma diferença estatisticamente significativa era encontrada o teste U, Mann-Whitney foi usado para determinar as diferenças entre cada par de grupos. Coeficientes de correlação foram calculados utilizando o teste de Spearman. Valores de P foram considerados significantes quando $\leq 0,05$. Redução de níveis séricos de osteocalcina foram encontrados em 43,5 % dos indivíduos HIV positivos e em 16% dos controles [P=0,0001; odds ratio (OR) 4,04; intervalo de confiança 95% 1,68-9,69]. Não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de osteocalcina, quando comparada nos grupos HIV positivos. Os níveis de osteocalcina apresentaram uma correlação positiva com a contagem de células CD4 [r=0,067 ; P=0,587] e uma correlação negativa com a carga viral [r=- 0,228; P=0,06]. Pacientes HIV positivos apresentaram acentuado decréscimo nos níveis séricos da osteocalcina. As hipóteses - de que o osteoblasto pode servir de reservatório para o HIV, de que a ativação sistêmica de células T aumenta a osteoclastogênese e que a osteopenia pode ser devida a toxicidade de mitocôndrias - podem explicar a interação da infecção pelo HIV e as alterações do metabolismo ósseo e mineral. Uma densidade mineral óssea reduzida já foi descrita em pacientes HIV+ e para comprovarmos que alterações nos níveis plasmáticos da osteocalcina podem levar a redução da massa óssea necessitamos de estudos prospectivos.

Abstract

HIV-infected patients have been shown to have alteration in bone mineral metabolism that appears to be related to the infection. Osteopenia has been associated with protease inhibitor (PI) therapy. However, direct interaction of HIV with cells of the bone, and bone marrow microenvironment, chronic T cell activation, and abnormal cytokine production affecting osteoblast and osteoclast function had been described in HIV-infected patients, before the use of antiretroviral therapy. The aim of this study is to investigate the influence of HIV infection on the serum osteocalcin levels. A cross-sectional study was performed on 69 HIV-infected patients [48 men, 21 women, mean age / (SD) 33 years (+-4)] pre-antiretroviral therapy. Fifty healthy seronegative adults matched by age, and sex served as controls. To analyze the possible relationship between the serum osteocalcin levels and disease severity the HIV-infected group, was stratified according to CD4 cell count into three groups of 23 patients: Group 1 CD4 cell count ≥ 500 , Group 2 CD4 cell count in between 499-200, Group 3 CD4 cell count less than 199. Osteocalcin levels were measured by an immunometric assay (DPC Corp., Los Angeles, CA) detecting intact osteocalcin (1-49) with a reference range of 3.1 -13.7 ng/ml. When comparing more than two groups, the Kruskal-

Wallis test was used. If a significant difference was found, the Mann-Whitney U test (two tailed) was used to determine the differences between each pair of groups. Coefficients of correlation were calculated by the Spearman rank test. Data are given as medians and 25-75th percentiles if not otherwise quoted. P values are two-sided, and considered significant when $<0,05$. Serum osteocalcin levels reduction was present in 43,5% of HIV infected patients and in 16% of controls [$P=0,0001$; odds ratio (OR) 4,04; 95% CI 1,68-9,69]. No statistical significant difference on osteocalcin levels were found in HIV-infected patients, irrespective of the CD4 cell count and viral load however serum osteocalcin concentration had a positive correlation with CD4 cell count [$r=0,067$; $P=0,587$], and a negative correlation with viral load [$r=-0,228$; $P=0,06$]. The HIV-infected patients showed marked decrease in serum osteocalcin concentration compared with non-HIV patients. The hypothesis that osteoblasts could act on as local HIV-1 reservoirs, the systemic activation of T cells in vivo leads an osteoprotegerin ligand-mediated increase in osteoclastogenesis and the hypothesis that osteopenia could result from mitochondrial toxicity, may explain the interaction of HIV infection, and alteration in bone mineral metabolism. Decreased bone mineral density has previously been reported in HIV-infected patients, and although the clinical consequences of our findings with disturbed osteocalcin levels remain unclear, it is conceivable that if these abnormalities persist over time, they may well lead to clinically significant bone loss.

Introdução

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA/AIDS), resultante da infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo I (HIV), pode afetar qualquer órgão de maneira direta ou indireta. Com a evolução dos estudos e da experiência com a AIDS, podemos observar uma variedade de alterações endócrinas relacionadas ao HIV, ocorrendo tanto em estágios iniciais, como tardios da doença (Hofbauer *et al.*, 1996). Tais alterações endócrinas decorrem do envolvimento direto do vírus nas glândulas, ou devido a infecções oportunistas, ou neoplasias associadas a AIDS, ou ainda a efeitos colaterais das drogas utilizadas para o tratamento da doença (Kuhne *et al.* 2001).

O mundo contemporâneo possui cerca de 40 milhões de pessoas portadoras do HIV (HIV, 2001). O Brasil tem, aproximadamente 600 mil portadores. Desde 1996, quando o governo começou a distribuir

gratuitamente a terapia antiretroviral, o crescimento da epidemia se estabilizou numa média de 20 mil novos casos por ano. Em 2000, houve início de declínio com o registro de 15 mil novos casos (UNAIDS, 2001).

Dentre as alterações endócrinas, observadas em pacientes portadores do HIV, destacam-se as do metabolismo ósseo e mineral por sofrerem influência direta hormonal na sua homeostase.

Interações entre células do tecido ósseo e do sistema imune são fundamentais para a manutenção do equilíbrio entre formação e reabsorção óssea. Citocinas como a Interleucina-1 (IL-1), IL-6, IL-11, o Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α) e a osteoprotegerina estimulam a atividade do osteoclasto aumentando a reabsorção óssea (Aukrust *et al.*, 1999; Kong *et al.*, 2000).

A ativação de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 e TNF- α , apresenta importante papel na patogênese da AIDS. Essa ativação pró-inflamatória contribui para a replicação viral, para o desenvolvimento da imunodeficiência e de algumas manifestações clínicas, como as encontradas nas anormalidades endócrinas vistas em pacientes infectados pelo HIV (Fauci, 1996).

Tem sido demonstrado que os níveis de marcadores bioquímicos do remodelamento ósseo em indivíduos portadores do HIV apresentam correlação com o grau de imunodeficiência possivelmente relacionada com o aumento da atividade do TNF- α (Serrano *et al.*, 1995; Haug *et al.*, 1998;

Mcnurlan *et al.*, 1998). Os metabólitos da Vitamina D apresentam sua função inibida na formação óssea, quando ocorre um aumento da atividade do TNF - α . Indivíduos infectados pelo HIV apresentam um aumento nos níveis de citocinas pro-inflamatórias ativadas e conseqüentes deficiências de 1,25-(OH)₂D, desenvolvendo alterações importantes no metabolismo ósseo que podem ser avaliadas pela determinação sérica dos marcadores de formação e reabsorção óssea (Jilka, 2001).

Dentre os parâmetros bioquímicos estudados dos marcadores ósseos de formação e reabsorção que sofrem influência da ação do HIV, destaca-se a osteocalcina.

Realizamos um estudo com objetivo de estimar a prevalência de alterações do marcador de formação - osteocalcina - em indivíduos portadores do HIV (virgens de tratamento antiretroviral) na cidade de Salvador-Bahia, comparando os achados da osteocalcina destes indivíduos HIV+ com indivíduos HIV - provenientes da mesma população.

1.1 ESTRUTURA E FUNÇÃO DO OSSO

1.1.1 ORGANIZAÇÃO MACROSCÓPICA DO OSSO

No plano macroscópico, há dois tipos mais importantes de osso: osso compacto ou cortical e osso trabecular. O osso cortical está localizado na diáfise dos ossos longos e nas superfícies de ossos chatos onde existe, também, uma fina concha cortical nas epífises e metáfises dos ossos longos. Osso trabecular é limitado às regiões efiseais e metafiseais dos ossos longos

e está presente dentro das coberturas corticais nos ossos menores chatos e mais curtos (Glimcher, 1976).

A diferença entre osso cortical e osso trabecular é tanto estrutural quanto funcional. Eles são, porém, constituídos pelas mesmas células e pelos mesmos elementos matriciais. As diferenças estruturais são essencialmente quantitativas: 80-90% do volume de osso compacto é calcificado versus 15-25% no osso trabecular (o volume restante é ocupado pela medula); mas 70-85% da interface com tecidos moles está na superfície óssea endosteal (Glimcher 1976). As diferenças funcionais são uma consequência destas diferenças estruturais e vice-versa. O osso cortical exerce, principalmente, uma função mecânica e protetora e o osso trabecular, uma função metabólica.

1.1.2 Matriz óssea e mineral.

O osso é formado por fibras de colágeno (tipo I – 90% de proteínas totais). Cristais de hidroxiapatita em forma de fuso $[Ca_{10} (PO_4)_6(OH)_2]$ são encontrados nas fibras de colágeno e dentro delas. São geralmente orientados na mesma direção preferencial que as fibras de colágeno (Termine *et al.*, 1996).

A matriz óssea calcificada não é metabolicamente inerte e células (osteocitos) são encontradas enraizadas bem fundo, dentro das pequenas lacunas osteocíticas (25.000/mm³ de osso). Elas eram, originalmente, células formadoras de ossos (osteoblastos), que ficaram presas por sua própria

produção de matriz óssea, e depois se calcificaram (Vaes, 1988). Estas células têm numerosos e longos processos celulares, ricos em micro filamentos que estão em contato com processos celulares de outros osteócitos (junções de fenda freqüentes), ou com processos das células que revestem a superfície óssea (osteoblastos ou células de revestimento chatas no endóstio, ou no perióstio). Estes processos são organizados durante a formação da matriz e antes de sua calcificação, formando uma cadeia de pequenos canais finos dentro de toda a matriz óssea. Existe um espaço entre a membrana plasmática osteócita e a matriz óssea, tanto nas lacunas como nos pequenos canais, chamado de espaço periosteócito, que é preenchido com fluido extracelular (Marcus, 1994).

Os osteócitos podem ser as células primárias no osso que respondem à carga mecânica. O destino dos osteócitos é sofrer fagocitose e serem digeridos, juntamente com outros componentes do osso, durante a reabsorção osteoclástica. Os osteócitos podem, também, desempenhar um papel importante na regulação local da reorganização óssea (Termine, 1996).

1.1.3 O OSTEOLASTO E A FORMAÇÃO DO OSSO

O osteoblasto é a célula de envolvimento do osso responsável pela produção de constituintes da matriz e desempenha uma parte importante no processo de calcificação. Origina-se de uma célula tronco mesenquimal local (célula tronco estromal da medula óssea, ou célula mesenquimal do tecido conectivo) (Albin *et al.*, 1993). Estes precursores sofrem proliferação e se diferenciam em pre-osteoblastos e em osteoblastos amadurecidos. Os

osteoblastos nunca aparecem ou funcionam individualmente, mas são sempre encontrados em feixes de células cuboidais ao longo da superfície óssea (aproximadamente 100-400 células por local de formação óssea) (Termine, 1996).

No plano microscópico, o osteoblasto é caracterizado por um núcleo redondo na base da célula (em frente às superfícies ósseas), um citoplasma fortemente basofílico e um complexo de Golgi muito proeminente, localizado entre o núcleo e o ápex da célula (Glimcher, 1976). Os osteoblastos são sempre encontrados envolvendo uma camada de matriz óssea a qual estão produzindo e que ainda não está calcificada (tecido osteóide). A presença do osteóide deve-se à duração do tempo entre a formação da matriz e sua calcificação subsequente - o período de amadurecimento do osteóide leva cerca de 10 dias (Marcus, 1994). Atrás do osteoblasto, encontram-se normalmente uma ou duas camadas de células mesenquimais ativadas e pre-osteoblastos. A membrana plasmática do osteoblasto é caracteristicamente rica em fosfatase alcalina (a fosfatase alcalina sérica é usada como um índice de formação do osso) e foi demonstrado que tem receptores para hormônio paratireóideano (PTH), mas não para calcitonina (Stein, 1993). Os osteoblastos, também, expressam receptores de estrógeno nos seus núcleos.

1.1.4 O OSTEOCLASTO E A REABSORÇÃO ÓSSEA

O osteoclasto, célula que envolve o osso, é responsável pela reabsorção óssea. Embora o progenitor exato do osteoclasto ainda não tenha sido identificado, ele é claramente relacionado com a família monócita-

macrofágica (Vaes, 1988). O osteoclasto é uma célula gigante com múltiplos núcleos (4-20 núcleos), normalmente encontrada em contato com a superfície óssea calcificada e dentro de uma lacuna (lacuna de Howship), que é o resultado de sua própria atividade de reabsorção (Marcus, 1994). É possível encontrar até quatro ou cinco osteoclastos no mesmo local de reabsorção. A zona de contato com o osso é caracterizada pela presença de uma borda enrugada e fragmentos densos de cada lado desta borda, chamada a zona de selagem (zona clara). A zona de selagem separa a borda enrugada do espaço extracelular e pode funcionar para isolar o espaço onde se realiza a atividade celular, resultando na dissolução do osso pelo osteoclasto (Vaes, 1988). O marcador enzimático característico do osteoclasto é fosfatase ácida resistente ao tartrato (TRAP) (Minkin, 1982).

Enzimas lisossomais são ativamente sintetizadas pelo osteoclasto e são encontradas no retículo endoplasmático, no Complexo de Golgi e em muitas vesículas de transporte. Estas enzimas lisossomais são eliminadas, através da borda enrugada, no compartimento extracelular de reabsorção do osso, onde conseguem altas concentrações extracelulares porque o compartimento é selado (Minkin, 1982).

1.1.5 ACOPLANDO FORMAÇÃO E REABSORÇÃO ÓSSEA

A atividade destas células ósseas ao longo das superfícies do osso, principalmente a superfície endosteal, tem como resultado a remodelação óssea. Este é o processo pelo qual o osso cresce e se reorganiza. Formação óssea e reabsorção óssea, porém, não ocorrem ao longo da superfície óssea

ao acaso; porque são partes de um mecanismo de reorganização substituindo osso velho por osso novo (Termine, 1996). No esqueleto adulto normal, a formação óssea ocorre somente onde a reabsorção óssea previamente ocorreu. A seqüência dos acontecimentos no local de remodelamento é, portanto, ativação-reabsorção-formação. Durante a fase intermediária entre a reabsorção e a formação (fase reversa), os osteoclastos sofrem apoptose, formando uma linha de cimento que marca o limite de reabsorção e "cimentando" juntos o velho e o novo osso (Vaes, 1988). O mecanismo de acoplamento exato entre a formação do osso e a reabsorção do osso não foi ainda elucidado; todavia, pensa-se que citocinas (por exemplo, fatores de crescimento) podem desempenhar um papel crucial neste processo de acoplamento (Termine, 1996).

1.1.6 MATRIZ ÓSSEA

A matriz extracelular do osso é uma estrutura composta cujo componente predominante (85-90%) é o colágeno tipo I. Aceita-se, atualmente, que o gene para o colágeno tipo I é idêntico em todos os tecidos conectivos através do corpo. Portanto, é mais provável que a especificidade genética da matriz óssea extracelular reside dentro dos constituintes não colagenosos do tecido (Hulmes, 1992).

A formação de tecido ósseo mineralizado é um esforço sinérgico entre as células secretoras (osteoblastos) e o sistema vascular (Marcus, 1994). Esta ação coordenada resulta na construção de uma matriz extracelular funcional, onde o envolvimento destes tecidos é refletido pela

composição da matriz. Componentes macro moleculares derivados de modo endógeno da(s) célula(s) específica(s) de tecido – colágeno; osteocalcina; osteonectina; sialoproteína(s) óssea(s); proteínas que promovem o crescimento ósseo (fator de crescimento I semelhante à insulina (IGF-I), IGF-II; fator de transformação de crescimento β (TGF- β); fosfoproteínas; proteoglicanos e componentes da circulação, como as proteínas do plasma - podem ser encontradas como parte da matriz extracelular mineralizada (Aubin,1993). Colágeno, proteoglicanos e algumas proteínas não colagenosas são eliminadas na interface osteoblasta-osteóide. De modo inverso, a osteocalcina, e talvez outras macro moléculas que parecem se acumular no frente da mineralização ou na fase mineral, chegam via processos osteoblásticos e são eliminadas diretamente no frente - zona de mineralização ativa (Hulmes,1992).

1.1.7 COLÁGENO

O colágeno no osso é o do tipo I, que é o mesmo na pele e no tendão. Nenhuma outra forma de colágeno é encontrada na matriz óssea propriamente (exceto colágeno V). Pequenas quantidades de colágeno do tipo III e IV são encontradas confinadas a vasculatura óssea, ou ao tecido conectivo aderente - não mineralizados - não associados com células osteoblásticas (Nimni, 1983).

Independente de seu papel preciso na mineralização, as fibras de colágeno podem, pelo menos, ser consideradas como a armação estrutural ou andaime para o tecido onde a mineralização ocorre; além disso, poderiam

servir como elementos passivos de suporte e, meramente, definirem os espaços nos quais o mineral pode ser depositado.

1.1.8 PROTEÍNAS NÃO COLAGENOSAS

As mais importantes proteínas não colagenosas do osso são proteoglicanos, γ -ácido carboxiglutâmico (Gla), glicoproteínas, fosfoproteínas e proteínas do plasma (Silver, 1994). As proteínas osteocalcina e sialoproteína óssea parecem representar expressões únicas do fenotipo osteogênico.

1.1.8.1 Proteoglicanos

Uma das mais importantes classes de proteínas não colagenosas representadas na matriz mineralizada são os proteoglicanos (Hulmes, 1992).

Os proteoglicanos consistem de um cerne de proteína – onde se prendem cadeias de polissacarídeos, glicosaminoglicanos - que são fortemente polianiônicos devido aos grupos de carboxil e sulfato (Nimni, 1983). Alguns proteoglicanos são capazes de prender-se de maneira não covalente a cadeias do hialuronato formosaminoglicanos, formando assim complexos moleculares muito grandes (Hulmes, 1992).

1.1.8.2 Glicoproteínas

Muitas glicoproteínas são encontradas no osso. As mais importantes dentre elas são: sialoproteína óssea, osteopontina, osteonectina, fosfatase alcalina e os fatores de crescimento do osso; tais como, a proteína morfogênica óssea (BMP) e a IGF "like" (Hulmes, 1992). Apenas umas

poucas proteínas não colagenosas glicosiladas têm sido isoladas e caracterizadas em algum grau.

1.1.8.3 Sialoproteínas

A sialoproteína óssea foi uma das primeiras proteínas não colagenosas identificada e constitui mais ou menos 15% das proteínas não colagenosas (Termine, 1996).

Duas sialoproteínas - a osteopontina e a sialoproteína óssea (BSP) - previamente chamadas de sialoproteína I e II são moléculas de adesão celular. Outros tecidos - como a cartilagem, decídua e placenta - também contêm pequenas quantidades de proteínas ativadoras de BSP (Termine, 1993).

1.1.8.4 Osteonectina e outras glicoproteínas de ligamento

A osteonectina, osteopontina, sialoproteína óssea e muitas outras glicoproteínas podem ser consideradas glicoproteínas de ligação (como fibronectina, laminina e condronectina em outros tecidos), que se ligam ao colágeno, proteoglicanos e receptores da superfície da célula, criando um complexo supra molecular ordenado (Hynes, 1992). Estes glicoconjugados não somente mantêm a estrutura da matriz extracelular; mas, também, ajudam a regular as funções das células residentes. Estas, assim chamadas, proteínas de ligação têm várias atividades biológicas, incluindo a mediação da ligação celular e a disseminação e aumento do crescimento, migração e diferenciação celulares (Marcus, 1994). Estas glicoproteínas de ligação tecidual podem também suprimir o crescimento de células de outro tecido,

presumivelmente, como um mecanismo para manter a segregação de diferentes tipos de células. As alterações, nas interações de células com a matriz extracelular, ocorrem nas doenças inflamatórias e em outras doenças que levam à perda da estrutura e função do tecido (Hynes, 1992).

1.1.8.5 Fosfatase alcalina

As clássicas fosfatases alcalinas de vertebrados constituem um grupo de glicoproteínas isozímicas ligadas à membrana, com pesos moleculares de 100-200 kDa (Vaes, 1988). A ampla distribuição orgânica e de tecido de fosfatase alcalina sugere algum tipo de função generalizada. O fato desta proteína estar localizada primeiramente na membrana plasmática sugere uma função transportadora, ou transdutora (Termine, 1996). Diversas ações possíveis de fosfatase alcalina em biomineralização já foram propostas:

- Destrução local de inibidores do crescimento de cristais,
- Atuação como proteína de ligação de Ca,
- Atuação, como uma bomba-Ca (Ca²⁺-ATPase), em células ou membranas vesiculares;
- Atuação, como um regulador de divisão ou diferenciação celulares, ao agir como uma fosfatase fosfoproteína específica para tirosina.

Embora haja dados que dão suporte a cada uma destas ações, nenhuma função singular parece ser a principal ação da enzima (Stein, 1993).

1.1.9 Fatores de crescimento da matriz óssea

Fatores de crescimento polipeptídeos (Fatores de crescimento semelhantes à insulina e Fatores de crescimento de fibroblastos) desempenham um papel importante no desenvolvimento e crescimento de tecido ósseo. O osso é singular, por causa de sua abundante matriz extracelular mineralizada - que isola fatores de crescimento e modula sua ação biológica, através de modos complexos de liberação e apresentação a células responsivas (Marcus, 1994). Foi demonstrado que, a maioria dos peptídeos reguladores do crescimento para as células ósseas são produzidos por osteoblastos, à medida que se diferenciam (Delmas, 1993). Estes fatores de crescimento são, então, depositados na matriz do osso, juntamente com as proteínas ósseas estruturais como o colágeno tipo I.

Os efeitos do fator de crescimento polipeptídeo no osso são divididos em duas áreas de estudo: fatores endócrinos, produzidos exogenamente - que agem em células ósseas específicas - e fatores "locais", produzidos endogenamente com possível ação autócrina, ou parácrina (Stein, 1993).

1.1.9.1 Fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF-I a IGF-II)

Fatores de crescimento semelhantes à insulina são peptídeos com um alto grau de semelhança estrutural a pro-insulina, com importantes efeitos em todo o metabolismo (efeitos semelhantes à insulina) e crescimento de célula, diferenciação e mitose (Silver, 1994). Há duas formas principais que são reconhecidamente existentes: IGF-I (sinônimo da somatomedina C) e IGF-II (sinônimo do fator de crescimento do esqueleto). Recentemente, um grande

número de proteínas que se unem ao IGF (IGF-BP) foi descoberto (Bikle, 1997). As ações do IGF podem ser moduladas, a nível local, pela presença destes IGF-BPs. A presença de formas múltiplas de IGF-BP e a evidência de sua modulação local sugerem que estas proteínas poderiam funcionar através do corpo, para fornecer especificidade de tecido para as ações dos IGFs. A especificidade de tecido parece ser essencial, dadas as ações diversas dos IGFs em diferentes tecidos, e o fato de que os IGFs funcionam, também, como hormônios; bem como, fatores locais. Baseando-se em descobertas de que o IGF-II está presente no osso - produzido pelas células ósseas - e age nas células ósseas, propõe-se que o IGF-II seja um importante regulador local do metabolismo da célula óssea (Eyre, 1987).

1.1.9.2 Fatores de crescimento de fibroblastos

Os fatores de crescimento fibroblasto ligado a heparina (FGF) são importantes no desenvolvimento do esqueleto (Termine, 1996). Como outros fatores reguladores de crescimento na matriz óssea, os FGF são expressos e eliminados pelos osteoblastos durante a proliferação e diferenciação osteoblástica. Eles agem de maneira autócrina e parácrina nos osteoblastos (Bikle, 1997).

1.1.10 MEDIADORES DE REMODELAÇÃO ÓSSEA E REPARO

A remodelação óssea é regulada pelos hormônios sistêmicos e por fatores locais que afetam as células da linhagem osteoclasta e osteoblasta. Fatores locais não sistêmicos desempenham um papel direto e importante na remodelação óssea (Marcus, 1994).

Hormônios circulantes podem agir nas células do esqueleto - quer diretamente, quer indiretamente - modulando a síntese, ou efeitos de um fator de crescimento local, onde estimula, ou inibe a formação óssea, ou reabsorção do osso. Estes fatores podem desempenhar um papel crítico no acoplamento de formação óssea à reabsorção e, possivelmente, em processos patológicos (Stein, 1993).

Embora os mecanismos regulatórios locais de remodelação óssea normal não sejam totalmente entendidos, muitas informações sobre as interações da célula óssea têm sido obtidas através de estudos sobre células ósseas *in vitro*. O mecanismo de reorganização óssea é complicado, requerendo comunicação entre diversos tipos de células que respondem a hormônios sistêmicos e fatores liberados localmente (Nijheid *et al.*, 1996). A ativação seqüencial de células ósseas é iniciada pelo recrutamento de osteoclastos absorventes de osso para o local de remodelação. A fase de reabsorção é seguida pela chegada de osteoblastos, que substituem o osso escavado pelos osteoclastos. Células mononucleares da linhagem monócita-macrofágica podem estar envolvidas na coordenação das duas fases. As proporções de reabsorção e formação óssea estão intimamente relacionadas, e este "acoplamento", que é firme, permanece conservado sob muitas condições patológicas (Stein, 1993). O acoplamento das fases catabólicas e anabólicas da remodelação do osso pode também explicar a capacidade dos mais importantes hormônios de reabsorção óssea (PTH e 1,25-dihidroxitamina D₃), em estimular a formação. Claramente, o conceito de

acoplamento da célula óssea é importante para a interpretação das reações de tecido inflamatório no osso (Termine, 1996).

Além do contato celular direto, interações das linhagens de osteoblastos e osteoclastos podem requerer a liberação de moléculas mensageiras. As células de envolvimento da superfície do osso podem gerar sinais que governam o recrutamento dos osteoclastos. Esta hipótese é reforçada ao observar de que osteoblastos expressam receptores para os hormônios de reabsorção óssea o PTH e 1,25-dihidroxitamina D₃ (Nijei, 1996) e os osteoclastos expressam receptores para a calcitonina inibidora de reabsorção óssea. De modo semelhante, o recrutamento e proliferação de osteoblastos, seguindo reabsorção, pode depender de fatores de crescimento autócrinos ou parácrinos, posicionados na matriz óssea; ou liberados no local pelas células mononucleares, ou pelos osteoblastos (Bikle, 1997).

As prostaglandinas, leucotrienos, interleucina-1 (IL-1), fator de necrose de tumores (TNF), interleucina-6 e interferon-gama são citocinas que podem ser importantes reguladores de destruição e reparo ósseo em artrite reumatóide (Stein, 1993). Diversos fatores de crescimento sistêmicos e fatores de crescimento locais, provavelmente, participam do processo inflamatório crônico e estimulam a destruição óssea.

1.1.11 Controle Molecular do Remodelamento Ósseo

Os primeiros dados sobre a regulação central do remodelamento ósseo decorreram da pesquisa em ratos transgênicos buscando novas

moléculas que pudessem estar envolvidas com esse processo (Kong *et al.*, 2000). Uma dessas linhagens de ratos desenvolveu fraqueza nos ossos. Essa molécula foi subseqüentemente clonada e nominada como osteoprotegerina (OPG). OPG age como inibidor da maturação do osteoclasto e da sua ativação (Kong *et al.*, 2000). Ratos transgênicos para OPG apresentam osteopetrose, indicando que os níveis de massa óssea estão relacionados com os níveis de OPG. Baseado no estudo de ratos transgênicos e *knock-out*, procurou-se identificar o ligante para OPG. Esse ligante foi clonado e batizado como OPGL. Ratos mutantes para OPGL apresentaram severa osteopetrose caracterizada pela ausência de erupção de dentes incisivos ou molares na cavidade oral. Sabemos que a erupção dos dentes é um achado típico de osteopetrose, pois a reabsorção óssea é necessária para a abertura de passagem dos dentes pela mandíbula para sua erupção. O receptor para OPGL é denominado de RANK (do inglês: receptor ativador de NFB ligante). A ligação entre OPGL e RANK inicia o processo de osteoclastogenese pela células progenitoras e a ativação de osteoclastos maduros (Koong *et al.*, 2000). Ratos com a mutação genética para RANK são idênticos aos ratos *knock-out*, para OPGL. Todos esses experimentos genéticos e funcionais demonstram que o equilíbrio entre OPGL-RANK e os níveis bioquímicos de OPG ativada, regulam o desenvolvimento e ativação dos osteoclastos e do metabolismo ósseo. OPGL é expressa em linfonodos, baço e timo. Timócitos CD4⁻ e CD8⁻ e Linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ ativados assim como células dendríticas e células T ativadas expressam OPGL nas suas membranas. Células T ativadas podem diretamente interferir na formação de osteoclastos maduros e funcionais via OPGL (Figura 1).

Associado a esse fato, a estimulação de linfócitos T *in vivo* resulta em um aumento da osteoclastogênese mediada pela OPGL com subsequente perda óssea. Ativação crônica de células T, como ocorre na infecção pelo HIV, pode ter uma participação direta no remodelamento ósseo destes indivíduos via produção de OPGL. Esses fatos caracterizam uma explicação molecular para a perda óssea associada à doenças que envolvem a ativação do sistema imunológico. Teríamos, assim, um novo paradigma para a regulação por parte das células T do metabolismo ósseo.

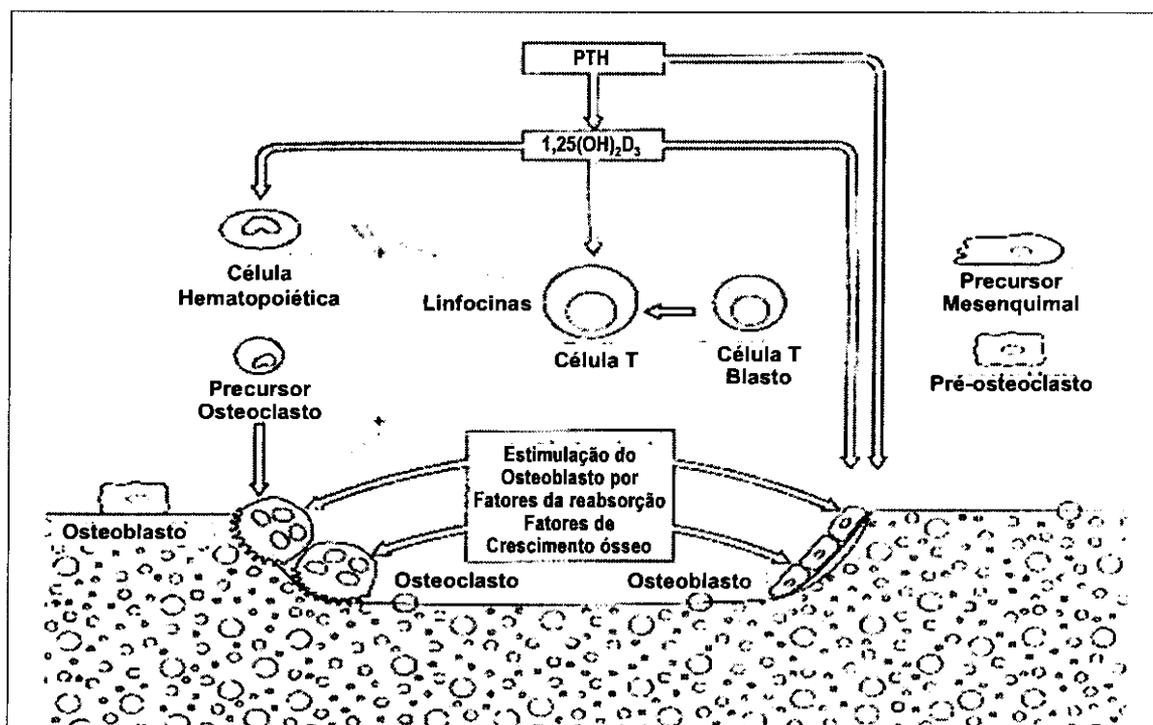


Figura 1. Imunomodulação do remodelamento ósseo
Retirado e adaptado de Stein, 1993.

1.1.12 OSTEOCALCINA

O osso, como muitos outros tecidos, contém proteínas que são modificadas por enzimas dependentes da vitamina K, para formar resíduos

do ácido gama-carboxiglutâmico (Delmas, 1993). Esses aminoácidos modificados fazem com que a proteína possua uma capacidade de se unir ao cálcio devido aos grupos carboxi que são criados (Chenu *et al.*, 1994). A osteocalcina é uma proteína dependente da vitamina K, com massa molecular de aproximadamente 5800 Dalton. Essa proteína é constituída por 49 aminoácidos, possuindo três resíduos do ácido 3 gama-carboxiglutâmico (GLA) na sua estrutura primária (posições 17, 21 e 24) (Figura 2). A Osteocalcina é uma das mais abundantes proteínas do osso, consistindo de até 3% da proteína óssea total (Delmas *et al.*, 1990). Trata-se de um peptídeo de meia vida muito curta com rápido metabolismo em fígado e rim. Pacientes com quadro de insuficiência renal apresentam, invariavelmente, níveis elevados de osteocalcina (Garnero, 1992). Estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem que a osteocalcina tenha importante papel no recrutamento e na diferenciação dos osteoblastos (Hosoda, 1992). A osteocalcina toma parte na função formadora do osso e é produzida pelos osteoblastos maduros, condrocitos hipertrofiados e odontoblastos (Chenu *et al.*, 1994). Seu aparecimento e aumento de produção coincidem com o início do processo de mineralização óssea. A osteocalcina é diretamente influenciada pelos hormônios reguladores do cálcio (calcitonina, hormônio paratireoideano, Vit. D). A osteocalcina tem sido extensivamente discutida como um indicador de prognóstico de progressão de doença óssea. Aproximadamente 20% da Osteocalcina sintetizada não se incorpora ao osso, por isso passa, para circulação sanguínea, podendo assim ser medida no soro (Garnero, 1992). Ela é totalmente destruída pela reabsorção mediada pelos osteoclastos.

Observam-se elevações da Osteocalcina nas patologias que cursam com um aumento da formação de novo osso, como na Doença de Paget, hiperparatireoidismo, metástases ósseas, osteomalacia e osteodistrofia renal (Chenu *et al.* 1994). A Osteocalcina circula em diferentes formas moleculares, que incluem a forma intacta 1-49 (36%), um fragmento aminoterminal grande 1-43 (40%) e os fragmentos menores aa 1-19,20-43, 29-49(34%). Trata-se de um marcador de formação óssea.

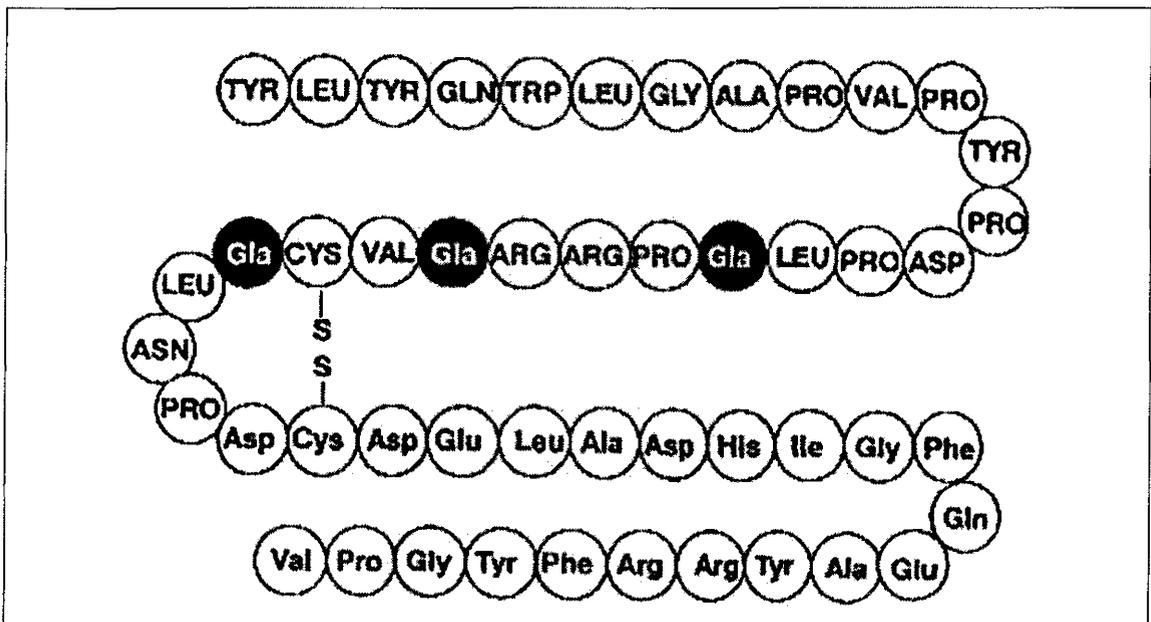


Figura 2. Estrutura da Osteocalcina
Retirado de: Delmas *et al.*, 1990.

1.2 O Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 1

Retrovírus são vírus que possuem material genético composto de ácido ribonucléico (RNA), utilizam transcriptase reversa para sua replicação e pertencem a família *retroviridae*.

Os vírus desta família podem ser classificados de acordo com vários critérios (Levy, 1992), tais como:

- a) forma de transmissão, em vírus endógenos e exógenos;
- b) estrutura morfológica, em grupos de A-D;
- c) patologias que causam, em duas subfamílias – *oncovirinae* e *lentivirinae*;
- d) relação de seqüência de nucleotídeos e estrutura genômica, definindo sete grupos de vírus. 1) sarcoma/leucose de aves; 2) tipo C de mamíferos; 3) vírus tipo B; 4) vírus tipo D; 5) grupo de vírus linfotrópico para células T humanas – vírus de leucemia bovina; 6) lentivírus; 7) espumavírus, que foram recentemente reconhecidos pela Comissão Internacional de Taxionomia de Vírus como gêneros distintos.

A associação entre as retrovirose e oncogênese em animais foi, claramente, a principal razão para se estudar os retrovírus antes do aparecimento da AIDS. Além disso, esta família de vírus está relacionada com muitas patologias humanas, como doenças respiratórias, desordens neurológicas e imunodeficiências. Por outro lado, a infecção causada por retrovírus pode também não causar nenhum dano aparente nos indivíduos portadores durante um longo período de tempo. A descoberta em 1980 do *human T-cell leukemia virus type I* (HTLV-I) demonstrou uma forte associação deste com a leucemia de células T do adulto (ATL),

sugerindo e confirmando pela primeira vez a correlação desta patologia com um retrovírus humano (Poiesz *et al.*, 1980, Yoshida *et al.*, 1982). Posteriormente, demonstrou-se que o HTLV-I está associado a doenças neurológicas importantes (Gessain *et al.* 1985; Osame *et al.*, 1986). O HIV foi o terceiro retrovírus humano a ser identificado (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983) e, certamente, o de maior importância para a saúde pública, devido a elevada taxa de morbidade e mortalidade da doença por ele causada.

1.2.1 Morfologia e estrutura Genômica:

O HIV-1 possui forma esférica com aproximadamente 100 nm de diâmetro (Figura 3). O envelope, sua porção mais externa, é composto por uma camada bilipídica onde se observa a presença de duas glicoproteínas de peso molecular de 120 kD (gp 120) e 41 kD (gp41). Esta última, situada na porção transmembranar do envelope viral, é responsável pela fusão da membrana viral com a membrana da célula hospedeira (Chan *et al.*, 1998). Já a primeira - a gp120 - situa-se na porção mais externa da superfície viral, está intimamente associada à gp41, participa dos processos de entrada do vírus na célula, ligando-se ao receptor na superfície da célula alvo (CD4) e aos correceptores (receptores celulares de quimiocinas). Além disso, esta proteína participa de fenômenos importantes - indução de anticorpos neutralizantes e na caracterização biológica do vírus (Abbas *et al.*, 2000).

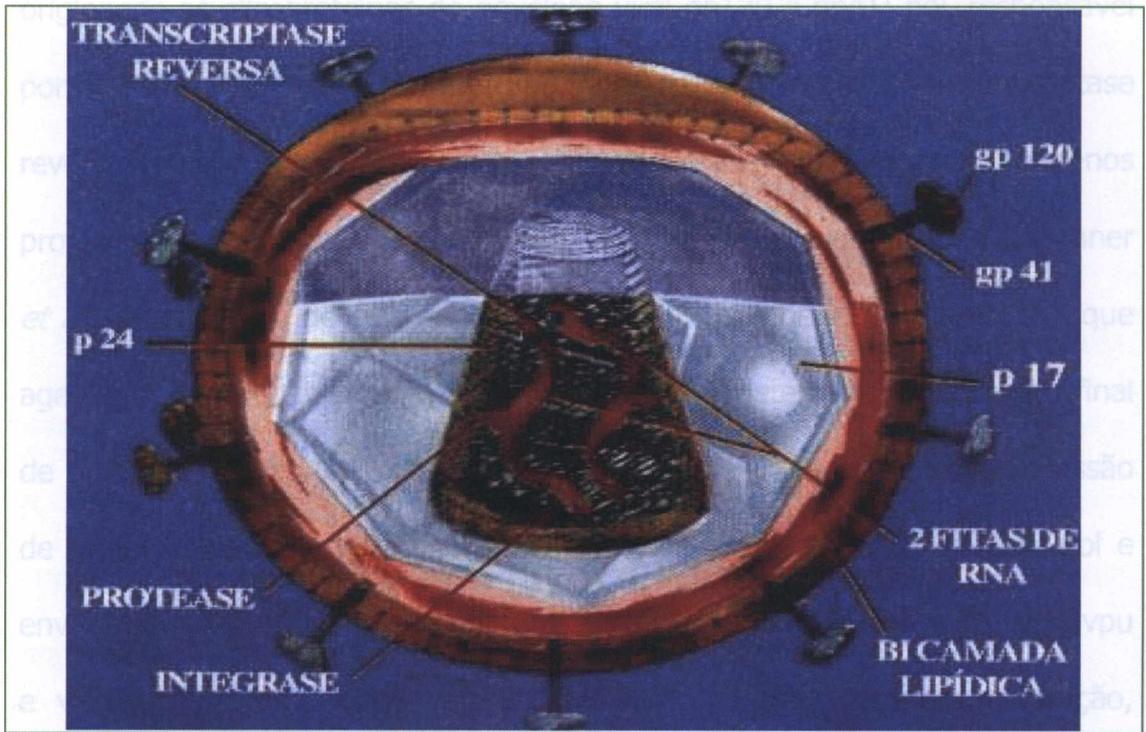


Figura 3. Representação esquemática da Estrutura do HIV

Fonte: Carga Viral, 1999

No espaço compreendido entre o envelope e o nucleocapsídeo, encontra-se a matriz com proteínas de peso molecular de 17 kD (p17). O nucleocapsídeo é constituído por duas moléculas de RNA (genoma viral) e das enzimas transcriptase reversa, integrase e protease que estão envolvidas pelo core (p24). Estas enzimas têm importância fundamental para a replicação viral e, a inibição das mesmas, constitui o principal alvo da terapia anti-retroviral.

O genoma do HIV-1 com cerca de 10 kd de comprimento está compreendido entre duas regiões de repetições terminais - LTR-3' e LTR-5'- entre as quais se encerram três genes constitutivos comuns para todos os retrovírus: env, codifica uma proteína precursora - a gp160 - que é clivada

originando as glicoproteínas do envelope viral gp120 e gp41; pol, responsável por codificar as enzimas utilizadas no processo de replicação viral, transcriptase reversa (p66 e p51), protease (p11), e integrase (p32); e gag (antígenos protéicos grupo-específico) codifica as proteínas do nucleocapsídeo (Zeichner *et al.*, 1994); além de seis genes regulatórios: tat - gene transativador - que age regulando positivamente a replicação viral e determina a expressão final de todos os genes virais; rev, gene responsável pela regulação da expressão de proteínas virais envolvidas no transporte e processamento do gag, pol e env; sendo só o rev capaz de antagonizar a expressão dos genes tat, vpr, vpu e vif, que parecem estar relacionados com os processos de maturação, empacotamento e brotamento do vírus, bem como a infectividade das partículas virais (Cullen *et al.*, 1998) e nef (fator regulador negativo) que está relacionado com o controle da expressão dos genes virais. Estes quatro últimos (vpr, vpu, vif e nef), constituem genes responsáveis pela codificação das proteínas acessórias. A divisão celular é um pré-requisito importante para a replicação na maioria dos retrovírus; porém, o HIV-1 pode infectar e multiplicar-se em macrófagos diferenciados que não se dividem (Emerman, 1996). Este fato é possível devido a ação da proteína Vpr que direciona a entrada do complexo de pré-integração (PIC) no núcleo da célula alvo através do complexo de poro nuclear (Connor *et al.*, 1995).

1.2.2 RESPOSTA IMUNE CONTRA O HIV

A infecção causada pelo HIV tem efeitos devastadores na resposta imune. Estes efeitos são mais evidentes nas fases aguda e crônica

sintomática, quando ocorre uma destruição acentuada de células T CD4⁺. Embora ocorra esta destruição, os indivíduos infectados desenvolvem uma resposta imune específica, tanto humoral, como celular (Dimitrov, 1997).

As glicoproteínas codificadas pelo gene *env*, gp120 e gp41, induzem a produção de altos títulos de anticorpos. Observa-se, também, títulos elevados de anticorpos contra proteínas dos genes *gag*, p17, p24 e p55, *pol* e da transcriptase reversa durante a infecção. Anticorpos anti-p24 surgem algumas semanas após a infecção e poderiam ter um papel importante no controle da viremia (Cohen *et al.*, 1998).

Como já foi visto anteriormente, uma das características dos lentivírus é apresentar uma grande variabilidade genética. A região variável V3 (alça V3) da gp120 é a porção mais externa do envelope viral e consiste de 35 aminoácidos flanqueados por 2 cisteínas (Coffin, 1995). Esta região é conhecida como principal domínio de neutralização, devido ao fato de peptídeos desta região induzirem a produção de anticorpos neutralizantes. No entanto, o papel destes anticorpos no controle da replicação viral, *in vitro*, é controverso (Cohen *et al.*, 1998).

Se por um lado, a detecção precoce de anticorpos neutralizantes com ampla especificidade se correlaciona com um melhor prognóstico da doença (Fenyö *et al.*, 1996, Cohen *et al.*, 1998) e com a redução de transmissão vertical (Scarlati *et al.*, 1993); por outro lado, estes anticorpos parecem não desempenhar nenhum papel no controle da infecção. Um outro

aspecto que deve ser salientado é a possível existência de anticorpos facilitadores da infecção (Levy, 1993).

Embora não esteja definido o papel da resposta humoral no controle da infecção, sem nenhuma dúvida, a detecção destes anticorpos é de grande importância para o diagnóstico laboratorial (Moore *et al.*, 2001). De fato, através de detecção de anticorpos específicos contra o HIV, pode-se estudar a história natural da infecção e controlar a disseminação através da transmissão sanguínea.

Existem evidências que a resposta imune, mediada por células ou por fatores solúveis produzidos por estas, desempenha um papel importante no controle da replicação viral. De fato, existe uma correlação entre o aparecimento de linfócitos T citotóxicos específicos para o HIV (CTL-HIV) e a diminuição da viremia (Borrow *et al.*, 1994). Observou-se também uma relação entre a diminuição de CTL-HIV e a progressão da doença. Mais recentemente, verificou-se que indivíduos freqüentemente expostos ao HIV, mas não infectados apresentam uma resposta CTL-HIV no sangue periférico. Stranford *et al.*, 1999 sugeriram a existência de uma associação da ausência de infecção nestes indivíduos e a presença de uma resposta mediada por células T CD8⁺ nas CTL-HIV-1. Vários fatores solúveis produzidos por células TCD8⁺ e T CD4⁺ tem uma atividade supressora na replicação do HIV.

Uma rede, altamente complexa de citocinas, opera para regular o sistema imune. Essa rede age estimulando ou inibindo a proliferação e a

diferenciação celular, modulando o funcionamento do sistema imune. Estas citocinas podem atuar regulando a replicação do HIV *in vitro*, como pode ser observado na tabela abaixo (Cohen *et al.*, 1998).

Vale ressaltar que resultados controversos da ação de algumas destas citocinas na replicação viral tem sido descrito.

Quadro 1. Efeitos das citocinas na replicação do HIV

Citocinas	Efeitos na replicação viral	
	Células T	Macrófagos
IL-1 β	Potencializa	Potencializa
IL-2	Potencializa	Sem efeito [#]
IL-3	Sem efeito [#]	Potencializa
IL-4	Potencializa	!
IL-6	Sem efeito [#]	Potencializa
IL-10	Inibe	!
IL-12	Potencializa	Sem efeito [#]
IL-13	Sem efeito [#]	Inibe
IL-15	Potencializa	Sem efeito [#]
IFN- α	Inibe	Inibe
IFN- γ	!	!
TGF- β	!	!
GM-CSF	Sem efeito [#]	Potencializa
TNF- α/β	Potencializa	Potencializa

Sem efeito notável ou ainda não foi testado.

! Possuem ambos efeitos, dependendo das condições da cultura

Retirado e adaptado de Cohen *et al.*, 1998.

Citocinas anti-inflamatórias, como, por exemplo, IL-10, inibem a replicação do HIV-1 por uma regulação da produção de citocinas potencializadoras da transcrição do RNAm do HIV (Cohen *et al.*, 1998).

Existe, também, uma perda seletiva da subpopulação de células T-auxiliadoras CD4⁺ de memória no início do curso da infecção; isto acontece possivelmente, devido a estas células expressarem altos níveis de correceptor CCR5. Essa observação explica a incapacidade de células T do sangue periférico serem ativadas quando recrutadas por antígenos (Cohen *et al.*, 1998).

Várias citocinas, particularmente as pro-inflamatórias IL-1 β e IL-6, exarcebam a replicação viral. TGF- β e IL-10 inibem a replicação viral (no caso da IL-10, esse efeito é pelo menos em parte devido à inibição de citocinas pro-inflamatórias). As β -quimiocinas, que são secretadas por uma variedade de tipos celulares incluindo células mononucleares CD8⁺ e CD8⁻, inibem fortemente a infecção por cepas R5; enquanto, SDF-1 inibe infecção por cepas X4 (Cohen *et al.*, 1997).

Foi também demonstrado que as quimiocinas α e β , elaboradas por células T, são fatores solúveis capazes de inibir a infecção. As β -quimiocinas RANTES (do inglês Regulated upon activation normal T-cell and secreted), MIP-1 α e MIP-1 β (do inglês macrophage inflammatory protein 1 α e 1 β) foram identificadas em 1995 (Cocchi *et al.*, 1995). Essa inibição resulta do bloqueio dos correceptores para a entrada do HIV na célula alvo.

1.2.3 A REPLICAÇÃO DO HIV

O HIV penetra na célula pela ligação da gp120 ao receptor CD4 da célula hospedeira. Participam, também, desse processo receptores secundários, como o CCR5 e o CXCR4 (fusina) (Dimitrov, 1997).

O DNA viral de dupla fita vai para o núcleo, sendo incorporado ao genoma da célula pela ação da integrase, e passa a ser chamado de provírus. Em um mesmo organismo o provírus pode, em algumas células, permanecer em latência e não dar sinal da sua presença (Cohen *et al.*, 1998). Em outras células, o processo replicativo pode ser lento com multiplicação controlada, ou acelerada, levando à lise celular (**Figura 4**).

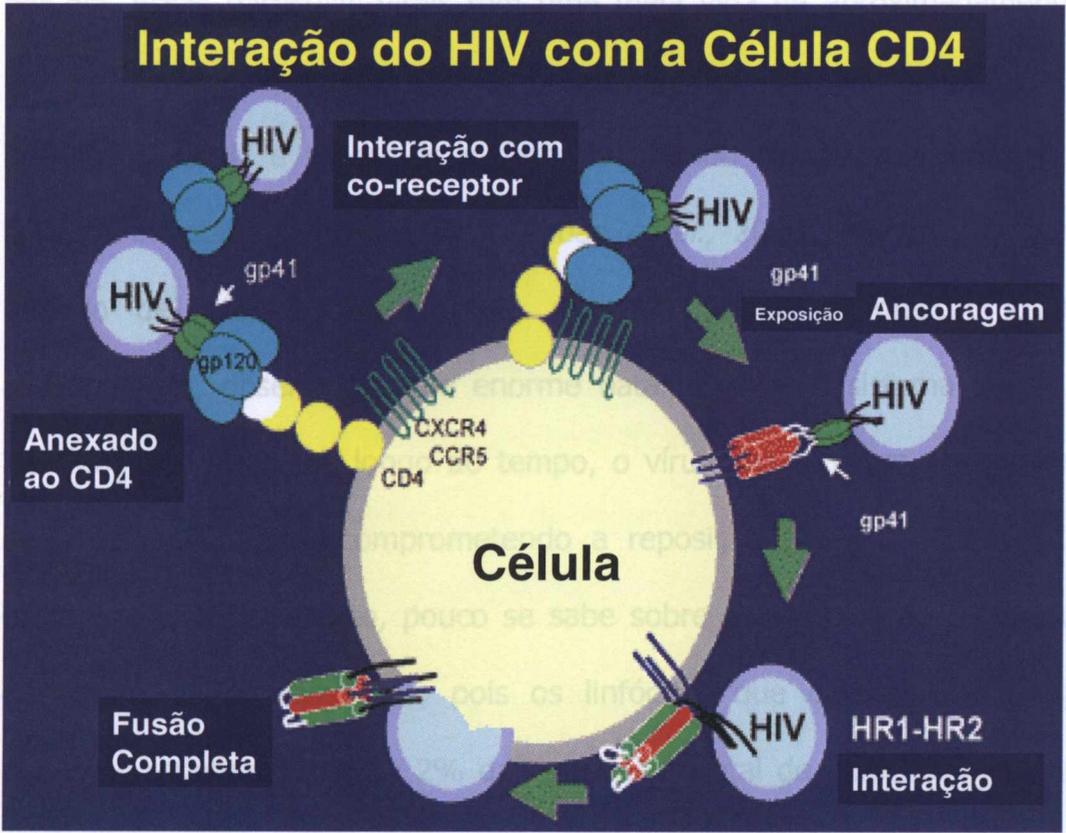


Figura 4. Interação do HIV com células T CD4⁺
Retirado e adaptado de <http://medscape.com>

O provírus, para se replicar, subverte a maquinaria celular e passa a comandar os mecanismos. Isso significa dizer, que as enzimas celulares passam a trabalhar na síntese de RNAs genômicos mensageiros (mRNA) e proteínas virais. As proteínas e RNAs virais são montadas em partículas que brotam de forma intensa da célula hospedeira, provocando a sua destruição (Moore *et al.*,2001).

1.2.4 DINÂMICA DO HIV NO ORGANISMO INFECTADO

As investigações, realizadas até o momento, demonstram que os linfócitos T CD4⁺ são as principais células-alvo do HIV (Cohen *et al.*, 1998). Estudos recentes indicam que cerca de 10 bilhões de vírus são produzidos por dia. Essas partículas virais têm uma meia vida de aproximadamente 4 horas (Moir *et al.*, 2000). De forma semelhante, um grande número de linfócitos T CD4⁺ é produzido e destruído, sendo que a meia vida de um linfócito infectado é de 2,4 dias (Abbas *et al.*, 2000). Não há, portanto, período de latência virológica e, mesmo durante a infecção crônica assintomática, observa-se uma enorme batalha entre o sistema imune do indivíduo e o vírus. Ao longo do tempo, o vírus desestrutura a arquitetura dos órgãos linfáticos, comprometendo a reposição dos linfócitos T CD4⁺ (Coffin, 1995). Entretanto, pouco se sabe sobre a dinâmica de produção e destruição de células CD4⁺, pois os linfócitos que circulam no sangue periférico refletem somente 2% da quantidade total de linfócitos existentes no organismo.

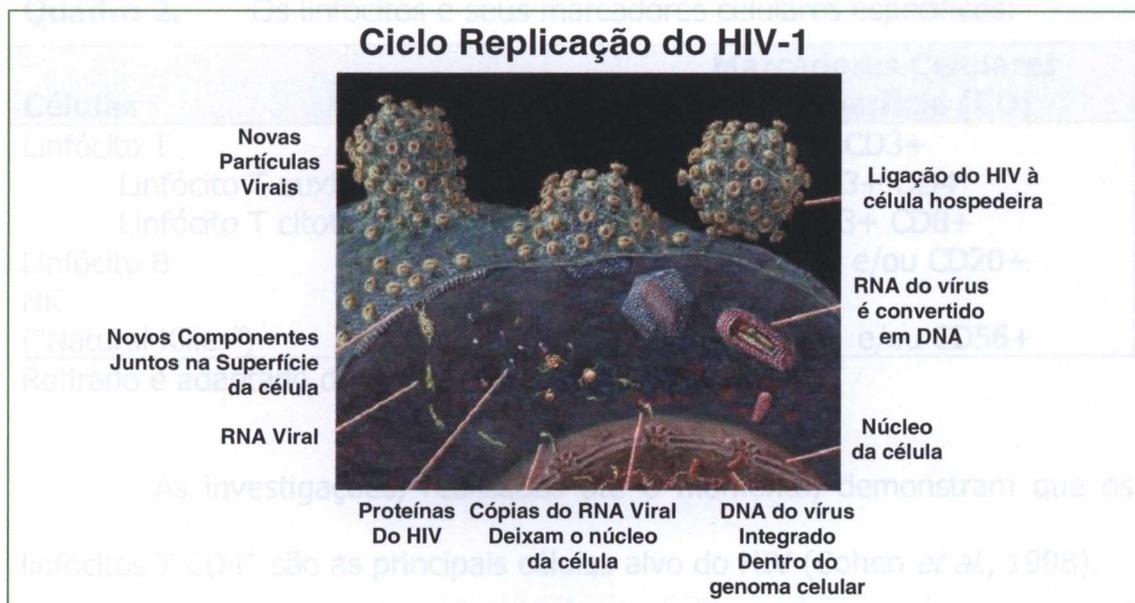


Figura 5. A REPLICAÇÃO DO HIV-1
Retirado e adaptado de <http://rkm.com.au>

1.3 Linfócitos

Os linfócitos são essenciais na resposta imune do organismo humano. Em condições fisiológicas, circulam no sangue periférico três populações distintas de linfócitos: os linfócitos T, os linfócitos B e as células NK (*natural killer*). Os linfócitos T são responsáveis pela regulação da resposta imunológica e pela destruição de células infectadas por vírus; os linfócitos B produzem os anticorpos e os linfócitos NK atuam na destruição de células infectadas por vírus e na de algumas células tumorais (Rabson, 1995).

É possível quantificar e classificar os linfócitos, identificando seus marcadores celulares de superfície; ou seja, moléculas específicas presentes na superfície dessas células.

Quadro 2. Os linfócitos e seus marcadores celulares específicos:

Células	Marcadores Celulares de Superfície (CD)
Linfócito T	CD3+
Linfócito T auxiliar	CD3+ CD4+
Linfócito T citotóxico/supressor	CD3+ CD8+
Linfócito B	CD19+ e/ou CD20+
NK ("Natural Killer")	CD16+ e/ou CD56+

Retirado e adaptado de Paxton *et al.*, 1996

As investigações, realizadas até o momento, demonstram que os linfócitos T CD4⁺ são as principais células alvo do HIV (Cohen *et al.*, 1998).

Os Linfócitos T CD4⁺ (L T CD4⁺) desempenham um papel central em regular a resposta celular imune a infecções. Essas células são comumente conhecidas como "helper", pois atuam em outras células do sistema imunológico para desencadear vários tipos de resposta imune; incluindo ativação de macrófagos, maturação e afinidade da resposta do anticorpo, aumento da atividade das células "killer" e das células T citotóxicas (Paxton *et al.*, 1996). A ação dos linfócitos T CD4⁺ se dá através da liberação de citocinas em resposta a estimulação por antígenos. Citocinas são moléculas mensageiras solúveis intercelulares que interagem com receptores específicos em suas células alvo. As mais importantes citocinas envolvidas na resposta imune mediada por células são: IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 e interferon-gamma (Paxton *et al.*, 1996). Já foi abordada anteriormente a importância das interleucinas para a regulação do metabolismo ósseo com estimulação de osteoblastos e osteoclastos. Sendo assim, uma baixa população de linfócitos T

CD4⁺ implicaria numa baixa produção de interleucinas com conseqüente alteração do metabolismo ósseo e mineral.

1.4 Osteocalcina e HIV

Conforme descrito anteriormente com o aumento da gravidade da infecção pelo HIV, citocinas como TNF- α e β , IL-6, TGF- β e Interferon-Gamma elevam-se no soro. Esta elevação concorre com uma redução na síntese de proteínas podendo levar as alterações ósseas encontradas nesses pacientes como diminuição da formação óssea, diminuição do número de osteoblastos e do *turnover* ósseo.

Teichmann *et al.*, (2000), demonstraram que a perda de células CD4⁺ está associada à uma redução na formação óssea e a osteocalcina pode ser um importante marcador na interpretação da resposta imune.

Nacher *et al.*, (2001), demonstraram que é possível infectar células da linhagem dos osteoblastos com diferentes cepas do HIV-1 o que sugere que osteoblastos poderiam ser considerados como células alvo para este vírus, possivelmente contribuindo para o estabelecimento de reservatórios locais.

Hofbauer *et al.*, (1996), Kuhne *et al.*, (2001) e Serrano *et al.*, (1995) apontam a osteocalcina como o único marcador do metabolismo ósseo que mostrou correlação estatisticamente significativa entre seus níveis séricos e a contagem de linfócitos T CD4⁺ em indivíduos portadores do HIV; demonstrando que, quanto maior for a gravidade da doença com um número

diminuído de linfócitos T CD4⁺, menor é o nível sérico da osteocalcina fato que pode refletir uma deficiência na formação óssea.

Dados epidemiológicos revelam que, no Brasil, temos cerca de 597 mil pessoas vivendo com o vírus da AIDS (UNAIDS, 2001) e desde o advento de novas e eficazes terapias antivirais essa população está vivendo mais e envelhecendo; assim uma alteração no metabolismo ósseo e mineral – que leva a uma diminuição na formação óssea - acarretará um crescimento na ocorrência de osteoporose com riscos de aumento da morbi-mortalidade e com elevação no custo do tratamento desta população.

Portanto, estudos que avaliem alterações no metabolismo ósseo e mineral de diferentes populações de indivíduos infectados pelo HIV poderão contribuir para o conhecimento da história natural, prevenção e tratamento de patologias osteo-metabólicas desta população.

CASUÍSTICA, MATERIAIS E **Objetivos**

2.1 PRINCIPAL: do estudo

Avaliar as alterações dos níveis plasmáticos da osteocalcina em indivíduos portadores do HIV, virgens de tratamento antiretroviral, em Salvador, Bahia.

3.2.1 Casos

2.2 SECUNDÁRIOS:

Comparar os níveis plasmáticos da osteocalcina com os marcadores de progressão da doença (Carga Viral e contagem de linfócitos T CD4⁺).

Comparar os níveis plasmáticos da osteocalcina do grupo de indivíduos HIV positivos com o grupo controle de indivíduos HIV negativos.

Laboratório Avançado de Saúde Pública – LASP da Fundação Oswaldo Cruz - para realizar a contagem de linfócitos T CD4⁺ (Facs count, Becton Dickison, CA, EUA) e carga viral plasmática (NASBA-Organon, Teknika Turnhout,

Bélgica). As amostras deste projeto retrospectivo são do registro, nome e endereço, para possibilitar sua inserção no anônimo desvinculada.

3.2.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO:

Foram incluídos neste estudo aqueles indivíduos com os seguintes critérios:

CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo seccional.

3.2 Populações de Estudo (amostra “de conveniência”)

3.2.3 CRITÉRIO DE EXCLUSÃO

3.2.1 Casos

Foram estudados 69 indivíduos infectados pelo HIV, dentre aqueles que procuraram o Ambulatório de AIDS da Unidade Docente Assistencial em Infectologia (UDAI), do Hospital Professor Edgard Santos (HUPES/UFBA), com o objetivo de obter tratamento antiretroviral. Para o recebimento gratuito da terapia, soros dos portadores do vírus eram encaminhados ao Laboratório Avançado de Saúde Pública – LASP da Fundação Oswaldo Cruz - para realizar a contagem de linfócitos T CD4⁺ (*Facs count*, Becton Dickison, CA. EUA) e carga viral plasmática (NASBA-Organon, Teknika Turnhout,

Bélgica). As amostras deste projeto retrospectivo são desvinculadas de registro, nome e endereço, para possibilitar sua inserção no estudo em forma anônima desvinculada.

3.2.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO:

Foram incluídos neste estudo aqueles indivíduos que preencheram os seguintes critérios:

- Idade entre 20 e 40 anos – o objetivo da escolha desta faixa etária foi o de evitar a inclusão no estudo de uma população com idade mais avançada, pois poderíamos ter indivíduos com alteração no marcador ósseo, relacionada à idade e/ou a alterações hormonais (menopausa).
- Virgem de tratamento anti-retroviral

3.2.3 CRITÉRIO DE EXCLUSÃO

- Quantidade de plasma disponível não ser suficiente para a realização do teste.

Esses indivíduos foram divididos nos seguintes grupos:

- Grupo I – linfócitos T CD4⁺ \geq que 500
- Grupo II - linfócitos T CD4⁺ entre 200 e 499
- Grupo III - linfócitos T CD4⁺ \leq que 199

3.2.4 CONTROLES

Como controles sadios e soronegativos para HIV e HTLV I/II foram utilizadas 50 amostras de plasmas de indivíduos provenientes de um estudo de corte seccional em habitantes da cidade de Salvador, Bahia. Esta cidade, situada no nordeste do Brasil tem, uma população constituída por 2.211.539 habitantes (IBGE 2000).

Os indivíduos avaliados foram provenientes de um trabalho realizado juntamente com o Instituto de Saúde Coletiva da Universidade Federal da Bahia (ISC/UFBA) - parte do projeto de saneamento Bahia-Azul - tendo como unidade de análise, espaços populacionais selecionados de acordo com acesso a saneamento básico e nível de renda (Teixeira, 2002). Todos os indivíduos incluídos neste estudo possuíam sorologia negativa para HIV I/II e HTLV I/II. Foram colhidas amostras de sangue de 1.385 indivíduos através da técnica de amostragem aleatória simples sem reposição com realização de pós-estratificação.

O protocolo desta investigação (BAHIA-AZUL) contemplava consentimento informado solicitado aos indivíduos sorteados com antecedência mínima de 48 horas, de acordo com a Resolução número 196/96 do Conselho Nacional de Saúde que dispõe sobre as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa envolvendo seres humanos.

3.3 MÉTODOS LABORATORIAIS

3.3.1 DOSAGEM DA OSTEOCALCINA

Para determinação dos níveis plasmáticos da osteocalcina, utilizamos o ensaio Immulite Osteocalcin (*Diagnostic Products Corporation – DPC, Los Angeles, CA, USA*) seguindo as recomendações do fabricante.

A faixa de normalidade para Osteocalcina IMMULITE, recomendada pelo fabricante do kit, é de: 3,1 a 13,7 ng/ml.

Precedendo a realização dos testes nos plasmas do estudo, a calibração do aparelho era realizada utilizando-se dois controles com concentrações de osteocalcina previamente conhecidas. Durante a realização dos testes, foram utilizados mais dois controles com objetivo de avaliar a performance do teste. Os controles eram utilizados do mesmo modo que os plasmas em estudo e colocados durante cada seqüência de testes, com objetivo de servir como controle interno de qualidade. Com objetivo de testar a reprodutibilidade do teste, repetimos de forma aleatória metade dos testes do grupo controle (25 testes) e 71% dos testes nos grupos HIV positivo (45 testes).

Dados da performance do teste como faixa de calibração, sensibilidade analítica, precisão, linearidade, recuperação e especificidade encontram-se em anexo.

3.3.2 Contagem de Linfócitos CD4⁺

As amostras de sangue foram obtidas por venopunção asséptica em tubos monovetes contendo anticoagulante EDTA (ácido etileno diamono tetracético). A coleta de 5ml de sangue total foi realizada no Hospital Professor Edgar Santos e as amostra enviadas ao Laboratório Avançado de Saúde Publica (LASP), com menos de 6 horas após a coleta para realizar a contagem de células CD4⁺ e Carga Viral.

Os linfócitos T CD4⁺, foram enumerados pelo sistema ***FacsCount*** (Becton-Dickson CA, USA), seguindo as especificações do fabricante e de acordo com O Manual de Contagem dos linfócitos T CD4⁺ da Coordenação Nacional de DST/AIDS.

Resumidamente, a identificação e classificação, por meio da citometria de fluxo, é feita com base nas seguintes características celulares: tamanho, granularidade ou complexidade interna e imunofenotipagem. As variações no tamanho e na complexidade interna permitem a classificação dos leucócitos, em linfócitos, monócitos e granulócitos.

A imunofenotipagem consiste na identificação de populações de células pelos seus marcadores de superfície. Nesse procedimento, são utilizados anticorpos monoclonais específicos ligados a compostos químicos fluorescentes, chamados de fluorocromos. Dependendo dos marcadores (CD) presentes na superfície da célula, a fluorescência será de cor diferente. Células marcadas com a mesma cor poderão ser facilmente identificadas e

contadas no citômetro de fluxo. Neste aparelho, as células são transportadas em um fluxo de líquido isotônico até um compartimento denominado câmara de fluxo, onde um feixe de raios laser incide sobre cada célula. Ao incidir sobre a célula, uma fração, ou seja, uma parte da luz é bloqueada frontalmente (FSC) e outra fração é dispersa lateralmente (SSC). A fração FCS é proporcional ao tamanho da célula e a fração SSC é proporcional à granularidade ou complexidade interna citoplasmática.

O sistema FACSCount fornece o número absoluto de linfócitos T auxiliares (CD3⁺/CD4⁺) e linfócitos T supressores/citotóxicos (CD3⁺/CD8⁺), a partir da medida de quatro parâmetros: FSC, SSC, FL1 (fluorescência 1) e FL2 (fluorescência 2).

3.3.3 Determinação da Carga Viral Plasmática.

A determinação de carga viral plasmática foi realizada pelo sistema NASBA HIV-1 RNA QT (Organon Teknika Turnhout, Bélgica) seguindo as recomendações do fabricante e de acordo com o Manual sobre Carga Viral da Coordenação Nacional de DST/AIDS. Este ensaio baseia-se na amplificação isotérmica de ácidos nucleicos para a determinação e quantificação do RNA de HIV-1 em plasma ou soros humanos. Esta quantificação compreende três etapas: extração, amplificação e detecção.

A extração envolve a lise do espécimen biológico em uma solução tampão apropriada para desnaturar as nucleases (Rnases e Dnases), inativar os agentes infecciosos e liberar os ácidos nucleicos.

Utiliza-se três RNA sintéticos ($Q_a=10^6$, $Q_b=10^5$ e $Q_c=10^4$) como controles internos, que se distinguem do RNA do HIV-1 (selvagem) em uma seqüência de 20 pares de bases, localizado na região *gag* a ser amplificada.

Adicionando sílica acidificada, os ácidos nucleicos se associam a ela. Esta imobilização dos ácidos nucleicos a uma fase sólida permite uma série de etapas de lavagens para retirar materiais solúveis. Os ácidos nucleicos são finalmente obtidos numa etapa final que envolve uma incubação da sílica em um pequeno volume de água a 56°C. Através dos calibradores podemos quantificar a amostra a ser pesquisada de RNA HIV-1 entre 10^3 e 10^7 moléculas

A amplificação do RNA virai da amostra ocorre simultaneamente com a dos calibradores internos. A amplificação da região *gag* do genoma do HIV pelo método NASBA, compreende atividades isotérmicas das enzimas transcriptase reversa, RNase e T7-RNA polimerase. Inicialmente, é feita a síntese da primeira fita de cDNA, pelo primer 1 (P1) que contem o sítio de reconhecimento da T7-RNA polimerase (promotor) que se anela á seqüência alvo do RNA do HIV-1. A extensão de P1 é realizada através da ação da transcriptase reversa resultando na síntese do cDNA. Em continuação, a RNase elimina a molécula de RNA do híbrido de DNA-RNA.

A síntese da segunda fita de DNA é realizada através da extensão do segundo *primer* (P2) pela transcriptase reversa produzindo uma copia de DNA de fita dupla contendo o sítio de reconhecimento promotor da T7- RNA

polimerase. Inicia-se, então, a síntese de grande quantidade de cópias de RNA pela T7- RNA polimerase. Essas cópias de RNA servirão de moldes para a síntese de novas moléculas de DNA. Como esses RNAs recém-sintetizados são complementares ao genoma do vírus, o primeiro: *primer* que se associa e eles é o P2. A síntese dos RNAs e DNAs é repetida de maneira cíclica até o término da amplificação isotérmica.

A detecção do RNA de HIV-1 em uma amostra baseia-se no princípio de eletroquimioluminescência.

Para separar as amostras amplificadas (WT, Qa, Qb e Qc), são acrescentadas alíquotas da amostra amplificada a quatro soluções de hibridação: cada uma é específica para uma das amostras amplificadas. As amostras amplificadas respectivas são hibridizadas com uma sonda de oligopérola (isto é, pérolas magnéticas revestidas com estreptavidina ligada á oligobiotina que são utilizadas como fase sólida) e uma sonda marcada com rutênio. As pérolas magnéticas que transportam o complexo de amostra amplificada hibridizada /sonda são capturadas na superfície de um eléctrodo por meio de um ímã. A tensão aplicada a esse eléctrodo desencadeia a reação de electroquimioluminescência (ECL). A luz emitida pelas sondas marcadas com rutênio é proporcional á quantidade de amostra amplificada. O cálculo baseado nas quantidades relativas das quatro amostras amplificadas revela a quantidade original de RNA de HIV-1 do tipo selvagem na amostra.

O sinal ECL para cada uma das reações de hibridização é determinado calculando-se a fração de sinais ECL do selvagem para Qa, Qb e Qc, deduzindo então o número de cópias de RNA selvagem do HIV-1 introduzidas, em relação às quantidades introduzidas dos RNAs calibradores. A computação da quantidade introduzida de RNA selvagem se faz pela aplicação de uma teoria específica de comparação/sobreposição de curvas. Vale a pena ressaltar que a inclusão dos calibradores na análise das amostras independentes permite a determinação individual do cálculo de RNA selvagem através de um algoritmo designado para avaliar a relação entre os sinais dos calibradores. Todas essas computações e avaliações são computadorizadas pelo sistema NASBA QT.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Calculou-se as estatísticas descritivas para as variáveis de estudo, de acordo com os grupos de interesse. Em seguida, testou-se a aderência à distribuição normal de probabilidades das variáveis de estudo através da prova de Shapiro-Wilk. Verificou-se, através do teste de Bartlett, as homogeneidades de variâncias para as variáveis em estudo. Para comparação entre os grupos, segundo as variáveis do estudo utilizou-se, os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Obteve-se o grau de correlação entre osteocalcina, CD4 e Carga Viral, através do teste de Spearman. Foram obtidos as estimativas de prevalência e respectivos intervalos de confiança a 95% (método exato binomial) da redução dos níveis de concentração séricos da osteocalcina entre indivíduos HIV positivos e negativos e entre os grupos

de HIV positivo. Foram calculadas as razões de prevalência, razões de chances e os respectivos intervalos de confiança (método de Cornfield) da redução dos níveis séricos de osteocalcina do grupo HIV positivo usando como referência o grupo HIV negativo. Adotamos como valores estatisticamente significantes um valor de $p \leq 0,05$.

A análise estatística foi efetuada utilizando-se o programa STATA versão 7.0.

diferença estatisticamente significativa quando comparada com o total de indivíduos infectados. No entanto o Grupo III apresentou uma proporção de indivíduos do gênero masculino (20 / 86,96 %

Em relação ao Grupo de indivíduos não infectados, 29 pertenciam ao gênero masculino enquanto 29 (58%) ao feminino. Os dados estão contidos na Tabela 1, Gráfico 1.

RESULTADOS

De acordo com a Tabela 1, observamos que a média de osteocalcina plasmática observada é compatível com a evolução da epidemia em São Paulo (Galvão-Castro *et al.*, 1997) e também compatível com o índice de relação homem/mulher infectados pelo HIV-1, observado no território nacional (Galvão-Castro *et al.*, 1996).

Para a avaliação da osteocalcina plasmática foram avaliados 69 indivíduos HIV-1 positivos, virgens de tratamento, distribuídos em 3 grupos de acordo com o número de linfócitos T CD4⁺ circulantes (Grupo I: CD4⁺ \geq 500, Grupo II: CD4⁺ entre 200 e 499, Grupo III: CD4⁺ \leq 199). Foram avaliados 50 indivíduos com sorologias negativas para HIV e HTLV I/II.

A análise dos 119 indivíduos envolvidos no estudo apresentou uma proporção de 57,98% de indivíduos do gênero masculino, uma idade mediana de 32 anos, com um intervalo interquartil de 8 anos.

Em relação aos indivíduos HIV+ observamos que 48 (69,56%) pertenciam ao gênero masculino e 21 (30,44%) ao gênero feminino, resultando em uma razão homem/mulher de 2,28. Os grupos I e II apresentaram 14 (60,86%) homens e 9 (39,14%) mulheres. Não havendo

diferença estatisticamente significativa quando comparada com a amostra total de indivíduos infectados. No entanto o Grupo III apresentou uma maior proporção de indivíduos do gênero masculino (20 / 86,96 %).

Em relação ao Grupo de indivíduos não infectados, 21 (42%), pertenciam ao gênero masculino enquanto 29 (58%) ao feminino. Estes dados estão contidos na Tabela 1, Gráfico 1.

De acordo com a análise destes dados, a distribuição por gênero observada é compatível com a evolução da epidemia em Salvador (Dourado *et al.*, 1997) e também compatível com o índice de relação homem/mulher infectados pelo HIV-1, observado no território nacional (Galvão-Castro *et al.*,1996).

De acordo com a Tabela 1, Gráfico 2, observa-se que a média e a mediana de idade dos indivíduos foi semelhante nos diferentes grupos estudados. No entanto, o grupo de indivíduos não infectados apresentou uma média ligeiramente menor (29,88).

Como os níveis da contagem de linfócitos T CD4⁺ foram utilizados como critérios para formação dos grupos, suas distribuições foram diferenciadas de acordo com cada grupo (Tabela 1, Gráfico 3), fato esse esperado.

Em relação aos níveis de carga viral plasmática (Tabela 1) verificou-se que o grupo III apresentou os maiores níveis com um valor mediano,

aproximadamente, 5 vezes maior do que o valor mediano do grupo 2 e 16,7 vezes maior que o valor mediano do grupo I.

Tanto os níveis de CD4, quanto a carga viral (Tabela 1) apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos de indivíduos HIV+.

Observa-se que houve uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,0001$) dos níveis de osteocalcina entre os grupos (Tabela 2, Gráfico 4), sendo que, essa diferença se deveu ao grupo controle que apresentou níveis significativamente maiores entre os grupos.

Entre os indivíduos HIV+ verificou-se uma correlação inversa ($r = -0,228$) não estatisticamente significativa ($p=0,06$) entre os níveis de osteocalcina e carga viral.

O número de CD4 e osteocalcina apresentaram uma tendência de correlação positiva ($r = 0,067$) não estatisticamente significativa ($p=0,587$)

Verificou-se que a prevalência da redução dos níveis plasmáticos da osteocalcina nos indivíduos HIV+ foi maior do que nos HIV-, com uma *razão de prevalência* (RP) de 2,72 [1,36-5,42]. Entre os grupos de indivíduos HIV+ a prevalência variou de 30,4% a 56,5%, sendo esta no grupo II (Tabela 3). O grupo I foi aquele que apresentou a menor RP e o grupo II a maior (Tabela 3).

Tabela 1. Dados demográficos, osteocalcina, CD4 e carga viral nos grupos estudados.

	HIV-negativo		HIV-positivo	
	N=50	CD4 \geq 500 N=23	CD4 200-499 N=23	CD4 \leq 199 N=23
Idade				
Mínima	21	23	24	21
Mediana	30	35	33	34
Máxima	39	40	40	39
Média / dp	29,88 / 5,52	33,37 / 5,27	33 / 4,17	32,04 / 4,43
*Valor de p	0,0231	0,0230	0,7795	0,2620
Gênero				
Masculino	42	60,87	60,87	86,96
Feminino	58	39,13	39,13	13,64
Osteocalcina				
Mínima	0,9	1,0	2,0	0,2
Mediana	3,9	3,4	2,9	3,5
Máxima	5,6	4,0	4,0	4,4
Média / dp	3,88 / 0,97	3,02 / 1,03	2,92 / 0,65	2,50 / 1,63
*Valor de p	0,0198	0,0010	0,6290	0,0004
CD4				
Mínima		505	200	1
Mediana		717	318	65
Máxima		1032	466	194
Média / dp		752,43 / 150,15	331,26 / 95,78	81,22 / 68,75
*Valor de p		0,2863	0,0224	0,0176
Carga viral				
Mínima		399	1000	15000
Mediana		9600	31000	160000
Máxima		74000	1400000	2900000
Média / dp		17938,17 / 21281,09	163921,74/ 316069,57	377217,39 / 663248,75
*Valor de p		0,0001	0,0001	0,0001

* Shapiro -Wilk

Tabela 2. Comparação das distribuições das variáveis de estudo entre grupos.

VARIÁVEL	VALOR DE P
OSTEOCALCINA	0,0001*
GRUPO I X II	0,2905**
GRUPO I X III	0,7000**
GRUPO II X III	0,8776**
GRUPO I X CONTROLE	0,0011**
GRUPO II X CONTROLE	0,0001**
GRUPO III X CONTROLE	0,0009**
CD4	0,0001*
GRUPO I X II	0,0001**
GRUPO I X III	0,0001**
GRUPO II X III	0,0001**
CARGA VIRAL	0,0001*
GRUPO I X II	0,0023**
GRUPO I X III	0,0001**
GRUPO II X III	0,0089**

* Kruskal -Wallis

** Mann -Whitney

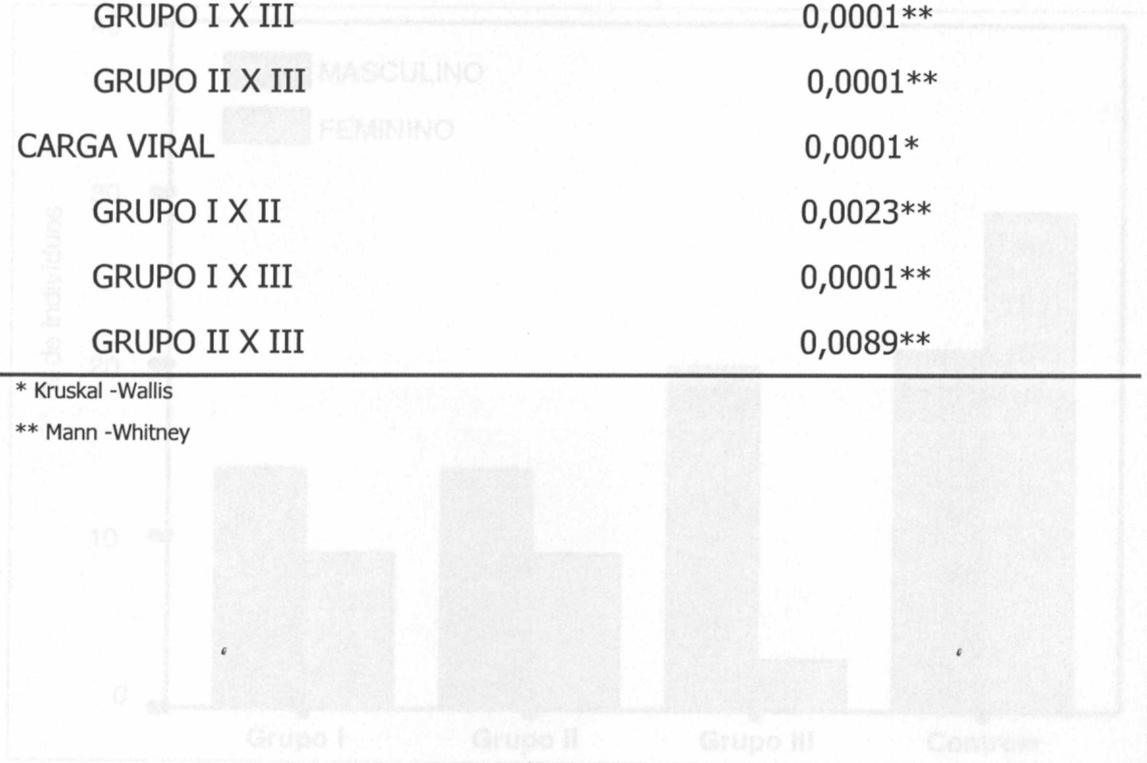


Gráfico 1. Distribuição dos grupos estudados por gênero.

Tabela 3. Prevalência, Razão de Prevalência e respectivos Intervalos de Confiança (95%) da redução dos níveis de osteocalcina entre os grupos de estudo.

	Prevalência	IC 95%	RP	IC 95%
HIV+	43,5	[31,6-56,0]	2,72	[1,36 – 5,42]
GRUPO I	30,4	[13,2-52,9]	1,90	[0,78 – 4,61]
GRUPO II	56,5	[34,5-76,8]	3,53	[1,70 – 7,33]
GRUPO III	43,5	[23,2-65,5]	2,72	[1,24 – 5,97]
HIV-	16,0	[7,17-29,1]	1	

Gráfico 2. Distribuição das idades entre os grupos de estudo.

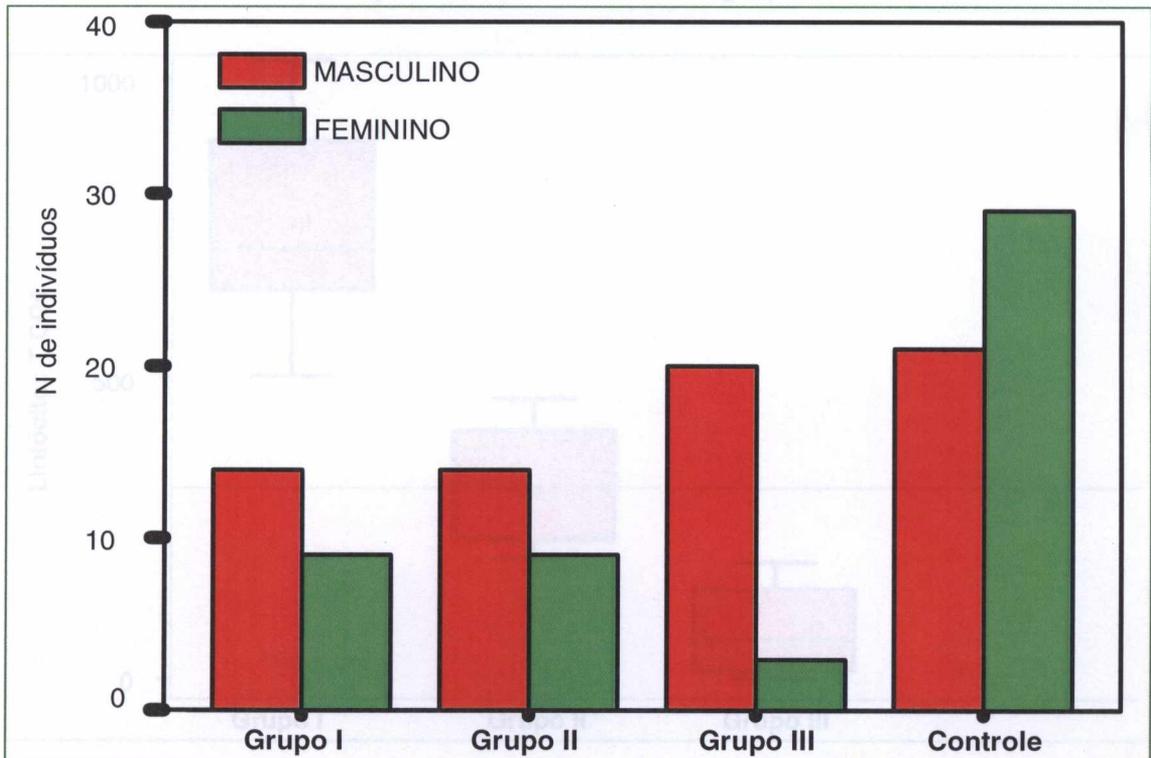


Gráfico 1. Distribuição dos grupos estudados por gênero.

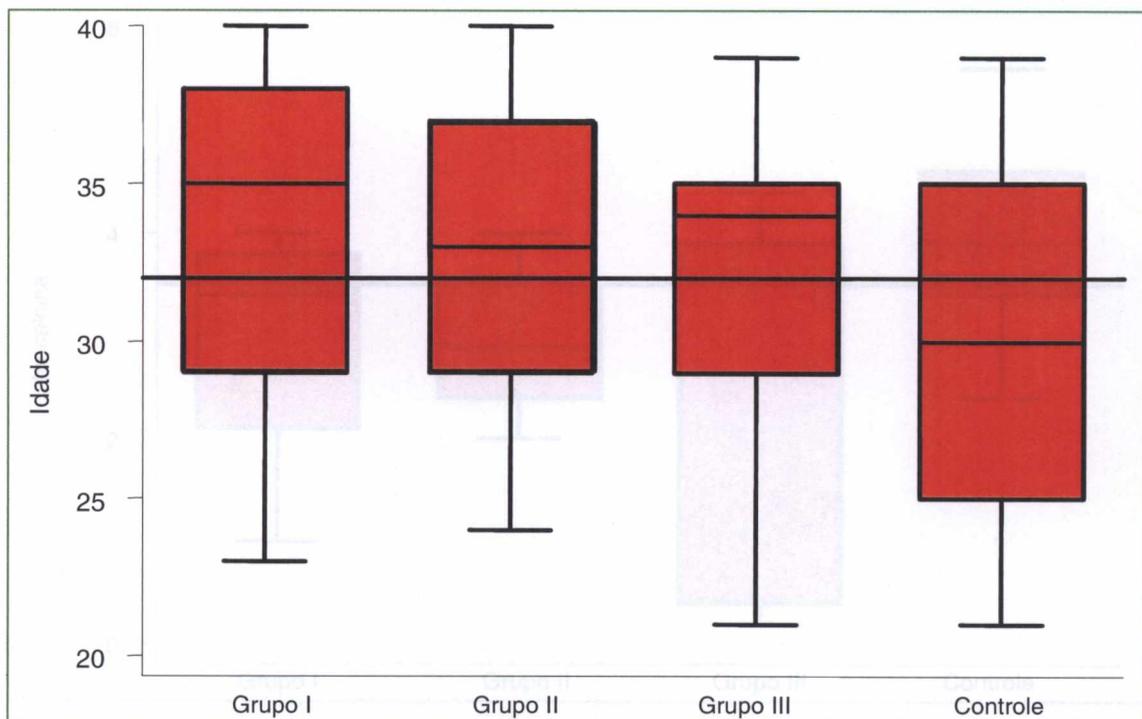


Gráfico 2 Distribuição das idades entre os grupos de estudo.

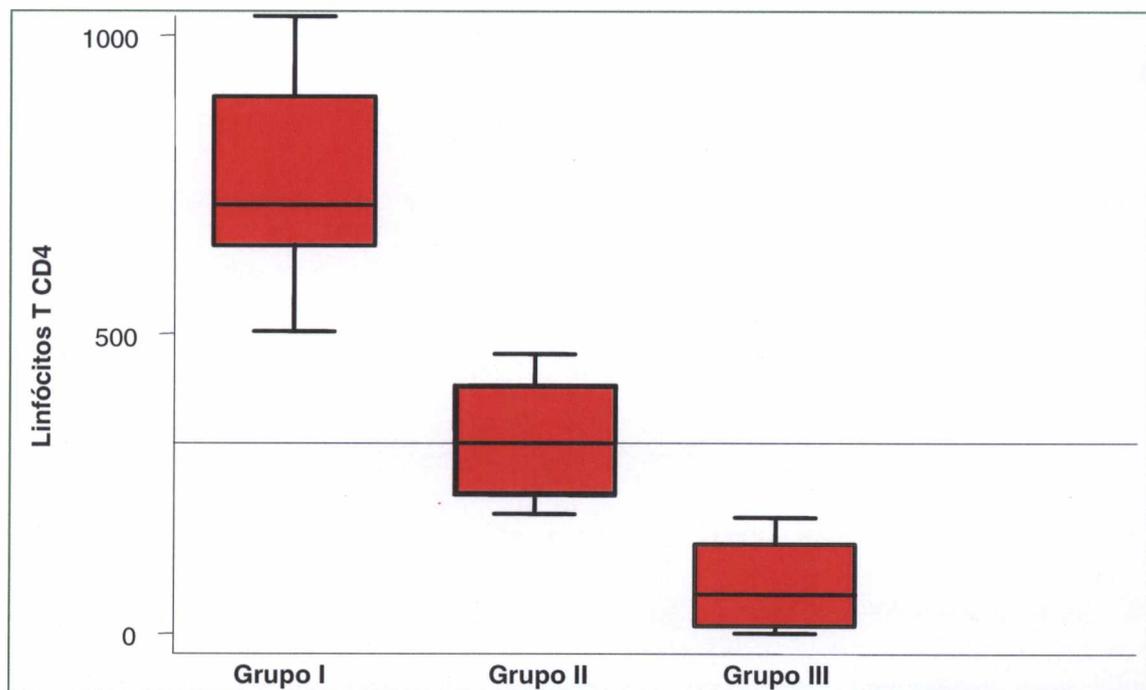


Gráfico 3 Distribuição do número de linfócitos T CD4⁺ entre os grupos HIV+.

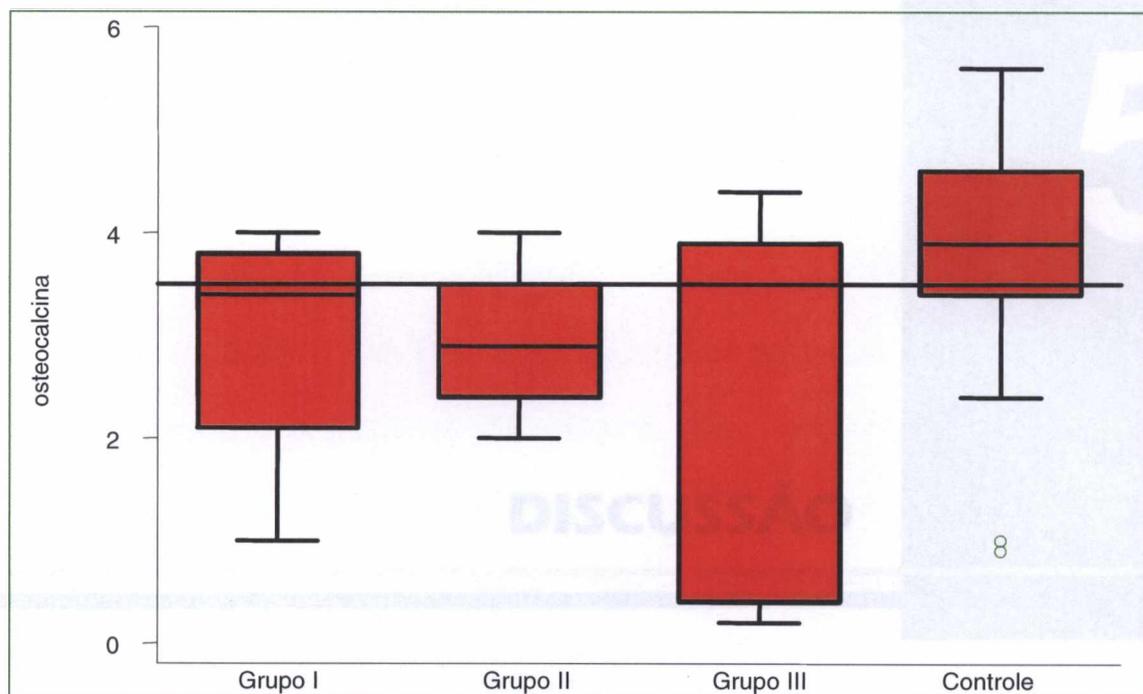


Gráfico 4. Distribuição dos níveis plasmáticos de osteocalcina entre os grupos de estudo.

Até o momento, poucas evidências sugeriam que o próprio HIV pudesse alterar os marcadores do metabolismo ósseo e mineral (Serrano *et al.*, 1995; Hernandez *et al.*, 1993; Aukrust *et al.*, 1999). A maior parte dos estudos apontava para o uso dos medicamentos antiretrovirais, como sendo os responsáveis por tais alterações (Tebas *et al.*, 2000; Carr *et al.*, 2001; Knobel *et al.*, 2001; Blakson *et al.*, 2002).

No presente trabalho, demonstramos pela primeira vez no Brasil que pacientes HIV positivos sem uso de medicamentos antiretrovirais apresentam acentuada redução nos níveis do marcador de formação óssea a osteocalcina. Observamos no grupo de pacientes infectados que 30 indivíduos (43,5%) apresentaram níveis plasmáticos de osteocalcina abaixo do valor normal; enquanto, somente 8 indivíduos dos 50 (16%) HIV negativos apresentaram níveis diminuídos. Esses achados confirmam raros

DISCUSSÃO

Ate o momento, poucas evidências sugeriam que o próprio HIV pudesse alterar os marcadores do metabolismo ósseo e mineral (Serrano *et al.*, 1995; Hernandez *et al.*, 1993; Aukrust *et al.*, 1999). A maior parte dos estudos apontava para o uso dos medicamentos antiretrovirais, como sendo os responsáveis por tais alterações (Tebas *et al.*, 2000; Carr *et al.*, 2001; Knobel *et al.*, 2001; Blakson *et al.*, 2002).

No presente trabalho, demonstramos pela primeira vez no Brasil que pacientes HIV positivos sem uso de medicamentos antiretrovirais apresentam acentuada redução nos níveis do marcador de formação óssea a osteocalcina. Observamos no grupo de pacientes infectados que 30 indivíduos (43,5%) apresentaram níveis plasmáticos de osteocalcina abaixo do valor normal; enquanto, somente 8 indivíduos dos 50 (16%) HIV negativos apresentaram níveis diminuídos. Esses achados confirmam raros

resultados anteriores (Hernandez *et al.*, 1993; Serrano *et al.*,1995). Pelo nosso conhecimento, nossos resultados representam a primeira demonstração de alteração do metabolismo ósseo em indivíduos infectados pelo HIV na América Latina.

Os níveis diminuídos de marcadores de formação óssea, tais como osteocalcina e o propeptideo do colágeno tipo-1 (Mcnurlan *et al.*, 1998), sugerem a ocorrência de uma alteração no metabolismo ósseo e mineral destes indivíduos com conseqüente redução da densidade mineral óssea (Kuhne 2001, Aukrust 1999). De fato, estudos têm demonstrado que osteopenia e osteoporose ocorrem em indivíduos infectados pelo HIV (Quero *et al.*, 1993; Serrano *et al.*, 1995; Paton *et al.*, 1997; McNurlan *et al.*, 1998), o que corrobora com esta hipótese. No entanto, estudos prospectivos necessitam ser desenvolvidos a fim de confirmar esta associação.

Observamos, no presente trabalho, uma correlação positiva entre número de linfócitos T CD4⁺ e **osteocalcina** ($r=0,06$); porém, sem significância estatística ($p=0,58$). Este achado não confirma relato anterior (Serrano *et al.*, 1995). Provavelmente pelo tamanho da amostra que foi uma limitação no presente estudo. Estes autores descreveram uma relação positiva e estatisticamente significativa entre a diminuição dos níveis plasmáticos de osteocalcina, número de Linfócitos T CD4⁺ e gravidade da doença.

No entanto, verificamos uma correlação inversa ($r=-0,22$) com um valor de $p < 0,06$, entre carga viral e osteocalcina plasmática na ausência

de terapia antiretroviral, confirmando resultado anterior (Aukrust *et al.*, 1999).

Algumas hipóteses podem ser aventadas para explicar a diminuição deste marcador de formação óssea, osteocalcina, no curso da infecção causada pelo HIV:

Esta diminuição poderia resultar de um efeito direto do vírus nas células responsáveis pela homeostasia óssea: osteoblasto e osteoclasto. A nossa observação de correlação inversa entre carga viral e osteocalcina poderia corroborar com esta hipótese. No entanto, é controversa a capacidade do HIV infectar osteoblastos maduros. Um estudo verificou que somente de 1 a 5 % de células de linhagens provenientes de osteosarcoma se infectam quando expostas ao HIV-1 (Mellert *et al.*, 1990). Porém, trabalho subsequente demonstrou que linhagens de células osteoblásticas não são susceptíveis em nenhum nível à infecção pelo HIV-1 (Toneguzzi *et al.*, 1995).

O HIV poderia também interferir na produção de osteocalcina infectando osteoclastos e, conseqüentemente, inibir a produção de fatores de atração quimiotática dos osteoblastos (Mundy *et al.*, 1983; Hughes *et al.*, 1996). No entanto, tem sido demonstrado que osteoclastos não são susceptíveis a infecção pelo HIV (Hofbauer *et al.*, 2000).

A ativação crônica de linfócitos T, mediada diretamente pelo HIV ou por infecções oportunistas associadas, leva ao aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias. Já foi demonstrado que citocinas como IL-1, IL-6,

IL-11, TNF- α e osteoprotegerina estimulam a atividade do osteoclasto aumentando a reabsorção óssea com conseqüente inibição da formação óssea (Aukrust *et al.*, 1999; Kong *et al.*, 2000). Sabe-se que a ativação de citocinas proinflamatórias (IL-1, TNF- α) apresentam importante papel na patogênese da AIDS (Fauci, 1996). A redução dos marcadores bioquímicos osteocalcina e o propeptideo do colágeno tipo 1 apresentam correlação com o grau de imunodeficiência que por sua vez esta relacionada com o aumento de atividade de TNF- α (Aukrust *et al.*, 1999). Não tivemos condições de avaliar nos pacientes estudados os níveis destas interleucinas; pois, também, não era o objetivo do presente estudo. Estudos que contemplem as variáveis mais significativas ligadas ao metabolismo ósseo e mineral de pacientes portadores de retrovíroses estão sendo planejados para serem realizados oportunamente.

Fatores que poderiam afetar o metabolismo ósseo como: doença óssea previa; alteração no metabolismo renal, ou hepático; diabetes mellitus; patologias endócrinas, ou gastrintestinais; medicamentos anticonvulsivantes, ou corticosteróide ou presença de alterações moderadas, ou severas no estado nutricional não foram avaliados no presente estudo; pois, os dados foram retirados de um banco cujas informações só contemplavam dados referentes ao uso de medicamentos antiretrovirais. Porém o Estudo Populacional de Tromso (Midtby *et al.*, 2001) avaliou quais eram os fatores biológicos que poderiam influenciar nos níveis dos marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo. Esse estudo avaliou fatores como consumo de álcool e cigarro; diferentes níveis de atividade física; tempo da ultima refeição;

historia de câncer; doenças na tireóide; doenças hepáticas e renais; historia de fraturas; doenças ateroscleróticas; asma; diabetes e menopausa, concluindo que de todos os fatores avaliados somente a menopausa teve influência nos valores de osteocalcina na população estudada. Este estudo demonstrou, também, que na faixa etária compreendida entre 20 e 29 anos os níveis de osteocalcina encontravam-se extremamente elevados. Estes dados reforçam a nossa hipótese de que o próprio HIV seria o responsável, direto ou indiretamente, pelas alterações dos níveis plasmáticos da osteocalcina na nossa amostra.

No presente estudo, a tendência de redução dos níveis de osteocalcina foi cada vez maior com o aumento da carga viral. A significância clinica decorre do fato que temos uma população jovem com alteração grave em seu marcador de formação óssea, podendo desenvolver quadro como a osteoporose em idade inferior a esperada na população HIV negativa. Baseado em nossos achados, a prevalência de alterações nos níveis de osteocalcina de um individuo HIV positivo foi de 2,72 vezes maior, quando comparado com indivíduos HIV negativos.

Considerando o número de indivíduos infectados pelo HIV, no Brasil, e que grande parte deles esta sob terapia antiretroviral, a utilização do marcador osteocalcina poderia determinar quais individuos estariam em risco de desenvolver alterações no seu metabolismo ósseo e mineral e, portanto poderiam se beneficiar de medidas preventivas para a manutenção de sua saúde óssea.

CONCLUSÕES

- Indivíduos portadores do HIV apresentam redução estatisticamente significativa nos níveis do marcador de formação óssea osteocalcina, quando comparados com indivíduos HIV negativos.

- A prevalência de redução dos níveis plasmáticos de osteocalcina é 2,72 vezes maior no grupo HIV positivo.

- Não foi observada relação estatisticamente significativa (considerando um $p \leq 0,05$) entre a redução dos níveis plasmáticos de osteocalcina e os marcadores de progressão da doença (linfócitos T CD4⁺ e Carga Viral).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbas AK; Lichtman AH; Pober JS. Congenital and Acquired Immunodeficiency. In: Cellular and molecular immunology, 4. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2000.20:393-408.
2. Aubin J, Turksen K, Heerschee JNM. Osteoblastic cell lineage. In: Cellular and Molecular Biology of Bone. New York, Academic Press, 1993, 1-45
3. Aukrust P, Haug CJ, Ueland T, Lien G, Froland S. Decreased bone formative and enhanced resorptive markers in Human Immunodeficiency Virus Infection: Indication of normalization of the Bone-Remodeling process during highly active antiretroviral therapy. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism (JCEM) 1999;84(1):145-150

4. Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Alex blin C, Vezinet Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L, 1983. Isolation of a T lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Science 220*: 868-871.
5. Becton-Dickson. FacsCountR System Users Guide.1995
6. Bikle DD. Biochemical markers in the assessment of bone disease. *Am J Med 103*: 427-436,1997.
7. Blankson JN, Persaud D, Siliciano RF. The challenge of viral reservoirs in HIV-1 infection. *Annu Rev Med 53*:557-593, 2002.
8. Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MBA., 1994. Virus specific CD8+ cytotoxic T lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.*;68:6103-6110.
9. Carga Viral / Coordenação Nacional de DST e AIDS. Brasília: Ministério da Saúde,1999
10. Carr A, Miller J, Eisman JA., Cooper DA. Osteopenia in HIV-infected men: association with asymptomatic lactic acidemia and lower weight pre-antiretroviral therapy. *AIDS 2001*, 15:703-709.
11. Chan DC; Kim PS 1998. HIV entry and its inhibition. *Cell 93*:681-684.
12. Chenu C, Colucci S, Grano M. Osteocalcin induces chemotaxis, secretion of matrix proteins and calcium-mediated intracellular signaling in human osteoclast-like cells. *J Cel Biol 127*: 1149-1158, 1994.

13. Cocchi F, De Vico AL, Lusso P, 1995. Identification of RANTES, MIP 1 α and MIP 1 β as the major HIV suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* 270: 1811-1815.
14. Coffin JM. HIV population dynamics *in vivo*: implications for genetic variation, pathogenesis and therapy. *Science*, 267:483-489, 1995.
15. Cohen OJ, Kinter A, Fauci AS. 1997. Host factors in the pathogenesis of HIV disease. *Immunol Rev* 159: 31-48.
16. Cohen OJ, Weissman D, Fauci AS. 1998. The immunopathogenesis of HIV infection. In: PAUL W.E. In: *Fundamental immunology*. 4.^{ed}. Philadelphia: Lippincott Raven publishers, 1998. cap 44, 1455-1494
17. Connor RI, Chen BK, Choe S, Landau NR, 1995 Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type 1 in mononuclear phagocytes. *Virology*. 206: 935-944.
18. Cullen BR, 1998. HIV 1 auxiliary proteins: making connections in a dying cell. *Cell* 93:685-692.
19. Delmas PD, Chistiansen C, Mann KG, Price PA. Bone gla protein (osteocalcin) assay standardization report. *J Bone Min Res* 5: 5-10,1990.
20. Delmas PD. Biochemical markers of bone turnover. *Am J Med* 95: 11s-16s,1993
21. Dimitrov DS. How do viruses enter cells? HIV correceptor teach us a lesson of complexity. *Cell*, 91: 721 730, 1997.
22. Dourado I; Noronha CV; Barbosa AM; Lago R. Considerações sobre o quadro de AIDS na Bahia. *IESUS*, 2: 1-25, 1997.

23. Emerman M, 1996. HIV 1, vpr and the cell cycle. *Curr Biol.* 6: 1096-1103.
24. Eyre D. Collagen cross-linking amino acids. *Methods Enzymol* 144:115-136,1987
25. Fauci AS. Host factors and the pathogenesis of HIV induced disease. *Nature*, 384:529-534, 1996.
26. Fenyö EM, Albert J, McKeating,J, 1996. The role of humoral immune response in HIV infection. *AIDS*, 10:S97 S106.
27. Galvão Castro, B.; Couto Fernandez, J.C.; Mello, M.A.; Linhares De Carvalho, M.I.; Castello Branco, L.R.; Bongertz, B.; Ferreira, P.C.P.; Morgado, M.; Savino, E.; Tanuri, A.; The Brazilian Network For The Hiv 1 Isolation And Characterization. A nationwide effort to systematically monitor HIV 1 diversity in Brazil: preliminary results. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 91:335-338, 1996.
28. Garnero P. Measurement of serum osteocalcin with a human specific two-site immunoradiometric assay. *J Bone Miner Res* 7:1389-1398,1992.
29. Gessain A, Barin F, Vernant JC, Gout O, Maurs L, Calender A, de Thé G 1985. Antibodies to human T lymphotropic virus type I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet II*: 407-409.
30. Glimcher MJ. Composition, structure, and organisation of bone and other mineralized tissues and the mechanism of calcification. In: Grrep RO and Astwood EV (eds). *Handbook of Physiology: Endocri-*

nology. Vol 7, Washington DC, American Physiological Society, 1976, 25-116.

31. Haug CJ, Aukrust P, Froland S. Severe deficiency of 1,25-Dihydroxyvitamin D3 in Human Immunodeficiency Virus Infection: Association with Immunological hyperactivity and only minor changes in Calcium Homeostasis. *JCEM*, 83(11):3832-3838, 1998
32. Hernandez QJ, Ortego CN, Munoz TM, Martinez PMA, Torres-Puchol JM. Alteration in bone turnover in HIV-positive patients. *Infection*, 21:220-222, 1993.
33. Hofbauer LC, Heufelder AE. Endocrine Implications of Human Immunodeficiency Virus Infections. *Medicine* 1996; 75 (5)
34. Hofbauer LC, Miller RF. Low adrenal androgens in men with HIV infection and the Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Horm Res* 2000;44:35-39
35. Hosoda K. Sandwich immunoassay for intact human osteocalcin. *Clin Chem* 38: 2233-2238, 1992.
36. Hughes DE, Dai A, Tiffée JC. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF- β . *Nat Med* 2: 1132-1136, 1996
37. Hulmes DJ. The collagen superfamily-diverse structures and assemblies. *Essays Biochem* 27:49-67, 1992
38. Hynes R. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69:11-25, 1992
39. IBGE. IBGE CIDADES 2000. Disponível em: [http: www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br). Acesso em 13.Jun.2002

40. Jilka RL. Cell Biology of Osteoclasts and Osteoblast and the Hormones and Cytokines that Control their Development and Activity. Report of The 1st Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and the European Calcified Tissue Society. June, 2001.
41. Knobel H, Guelar A, Vallecillo G., Nogues X, Diez A. Osteopenia in HIV-infected patients: is it the disease or is it the treatment? *AIDS*, 15:807-808, 2001.
42. Kong YY, Penninger JM. Molecular control of bone remodeling and osteoporosis. *Exp Gerontol* 2000, 35:947-956
43. Kuhne CA, Heufelder AE, Hofbauer LC. Bone and Mineral Metabolism in Human Immunodeficiency Virus Infection. *Journal of Bone and Mineral Research* 2001;16(1):2-9
44. Levy JA: Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection 1993. *Microbiol Rev*, 57:183-289.
45. Levy, JA. 1992. Ed. The Retroviridae. New York: Plenum Press.
46. Manual de contagem de linfócitos T CD4⁺ / Coordenação Nacional de DST e AIDS. Brasília: Ministério da Saúde, 1998.
47. Marcus R. Organizational and functional aspects of skeletal health. In: Marcus R (ed). Osteoporosis. Boston, Blackwell Scientific Publications, 1994
48. McNurlan MA, Garlick PJ, Frost A, Lang CH, Gelato M. Albumin synthesis and bone collagen formation in HIV positive subjects: Differential Effects of Growth Hormone Administration. *JCEM* 1998;83(9):3050-3055

49. Mellert W, Kleinschmidt A, Schmidt J, Erfle V 1990 Infection of human fibroblast and osteoblast-like cells with HIV-1. *AIDS* 4: 527-535.
50. Midtby M, Magnus JH, Joakimsen RM. The Tromso Study: A population-based study on the variation in bone formation markers with age, gender, anthropometry and season in both men and women. *Osteoporos Int.* 2001, 12:835-843.
51. Minkin C. Bone acid phosphatase: tartarate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcif Tissue Int* 34: 285-290, 1982
52. Moir S; Malaspina A; LI Y; Chung TW; Lowe T; Adelsberger J; Baseler M; Ehler LA; Liu S; Davey RTD; Mican JAM, Fauci A S. B cells of HIV 1 infected patients bind virions through CD 2 1 complement interactions and transmit infectious virus to activated *T cells*. *J. Exp. Med.*, 192:637-645, 2000.
53. Moore JP; Parren PWI; Burton DR. Genetic Subtypes, Humoral Immunity, and Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vaccine Development. *J. Virol.*, 75:5721-5729, 2001.
54. Mundy GR, Poser JW. Chemotactic activity of the gamma-carboxyglutamic acid containing protein in bone. *Calcif Tissue Int* 35:163-168,1983.
55. Nacher M, Serrano S, Gonzalez A. Osteoblasts in HIV-infected patients: HIV-1 infection and cd4 function. *AIDS* 2001, 15:2239-2243.
56. Nijheid PJ, Burger EH. Cells of bone : proliferation, differentiation and hormonal regulation. *Physiol Rev* 66: 855-886,1996

57. Nimni ME. Collagen: structure, function, and metabolism in normal and fibrotic tissues. *Semin Arthritis Rheum* 13:1-86, 1983.
58. Osame M, Usuku K, Izumo S, Ijichi N, Amitani H, Igata A, Matsumoto M, Tara M 1986. HTLV I associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet I*: 1031-1032.
59. Osteocalcina Immulite , DPC MedLab , Catálogo LKOC 1
60. Paton NIJ, Macallan DC, Griffin GE, Pazianas M. Bone mineral density in patients with human immunodeficiency virus infection. *Calcif Tissue Int* 1997, 61:30-32
61. Paxton H, Gorman MRG. Laboratory evaluation of the cellular immune system. In: Henry JB, ed. *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. 19th ed. Philadelphia, PA: W.B. Saunders Company. 877-912, 1996.
62. Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC 1980. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 7415.
63. Rabson AR. Enumeration of T-Cell Subsets in patients with HIV infection. *AIDS Clinical Care*. 7: 1-3, 1995.
64. Scarlati G, Albert J, Rossi P, 1993. Mother to child transmission of human immunodeficiency virus type 1: correlation with neutralizing antibodies against primary isolates. *J Infect Dis*, 168:207-210.

65. Serrano S, Marinoso ML, Soriano JC, Rubies-Prat J, Aubia J, Nacher M. Bone Remodelling in Human Immunodeficiency Virus-1 Infected Patients. A Histomorphometric Study. *Bone* 1995;16(2):185-191
66. Silver JJ. An update on bone cell biology. *Curr Opin Orthop* 5:50-59, 1994.
67. Stein GS, Lian JB. Molecular mechanism mediating developmental and hormone regulated expression of genes in osteoblasts: an integrated relationship of cell growth and differentiation. In: Cellular and Molecular Biology of Bone. New York Academic Press, 1993, pp 47-95.
68. Stranford SA, Skurnick J, Louria D, Osmond D, Chang S Y, Sninsky J, Ferrari G, Weinhold K, Lindquist C, Levy JA, 1999. Lack of infection in HIV exposed individuals is associated with a strong CD8+ cell noncytotoxic anti-HIV response. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 96: 1030-1035
69. Tebas P, Powderly WG, Claxton S, *et al.* Accelerated bone mineral loss in HIV-infected patients receiving potent anti-retroviral therapy. *AIDS* 2000, 14:F63-F67.
70. Teichmann J, Stephan E, Disher T, *et al.* Changes in calciotropic hormones and biochemical markers of bone metabolism in patients with Human Immunodeficiency Virus infection. *Metabolism* 2000; Sept 49;9:1134-1139
71. Teixeira MG, Barreto ML, Costa MCN, Strina A, Martins Junior D, Prado M. Sentinel áreas: a monitoring strategy in public health. *Cadernos de Saúde Pública*, 2002, (1895): 1189-1195.
72. Termine JD, Robey PG. Bone matrix proteins and the mineralization process. In: Favus MJ (ed). *Primer on the Metabolic Bone Diseases*

and Disorders of Mineral Metabolism. Third edition. New York, Lippincott-Raven, 1996, p 25.

73. Toneguzzi S, Lisignoli G, Monaco MC, Facchini A. 1995. Osteoblastic cell lines are not susceptible to HIV-1 infection. *Boll Soc Ital Biol Sper*, 71: 275-279.
74. UNAIDS. HIV and AIDS in Americas: an epidemic with many faces.2001.Disponível em: <http://www.unaids.org>. Acesso em : 13.Jun.2002.
75. Vaes G. Cellular biology and biochemical mechanism of bone resorption. *Clin Orthop Relat Res* 231: 239-271,1988
76. Yoshida M, Miyoshi I, Hinuma Y, 1982. Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T cell leukemia and its implication in the disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79: 2031.
77. Zeichner SL, 1994. The molecular biology of HIV. *Clinics Perinat* 21:39.

Anexo 1 - Artigo Encaminhado para publicação na Revista AIDS

OSTEOCALCIN CONCENTRATION IN HIV-1 INFECTED PATIENTS PRE-ANTIRETROVIRAL THERAPY

It was estimated that in 2000 there were 597,400 individuals of both sexes between the ages of 15-49 years with HIV infection, corresponding to a prevalence of 0,65% (UNAIDS 2002). Updated for the end of 2001 place the figure at 610,000 individuals with HIV/AIDS, a prevalence of 0,65%.

Anexos

HIV infected patients have been shown to have alteration in bone mineral metabolism that appears to be related to the infection. Osteopenia has been associated with protease inhibitor (PI) therapy [2,3]. However, direct interaction of HIV with cells of the bone, and bone bone marrow microenvironment, chronic t cell activation [6], and abnormal cytokine production affecting osteoblast, and osteoclast function had been described in HIV-infected patients before the use of antiretroviral therapy [2-5].

The aim of this study is to investigate the influence of HIV infection on the serum osteocalcin levels. A cross-sectional study was performed on 69 HIV-infected patients [48 men, 21 women, mean age (SD) 33 years (+4)] pre-antiretroviral therapy. Fifty healthy seronegative adults matched by age, and sex served as controls. To analyze the possible relation between the serum osteocalcin levels and disease severity, the HIV-infected group was classified according to CD4 cell count into three groups of 23 patients:

Anexo 1 - Artigo Encaminhado para Publicação na Revista AIDS

OSTEOCALCIN CONCENTRATION IN HIV-INFECTED PATIENTS PRE-ANTIRETROVIRAL THERAPY.

It was estimated that in 2000 there were 597,443 individuals of both sexes between the ages of 15-49 years with HIV infection in Brazil, corresponding to a prevalence of 0,65% [UNAIDS 2002]. UNAIDS estimates for the end of 2001 place the figure at 610,000 individuals living with HIV/AIDS, a prevalence of 0,65%.

HIV-infected patients have been shown to have alteration in bone mineral metabolism that appears to be related to the infection. Osteopenia has been associated with protease inhibitor (PI) therapy [2,3]. However, direct interaction of HIV with cells of the bone, and bone bone marrow microenvironment, chronic t cell activation [6], and abnormal cytokine production affecting osteoblast, and osteoclast function had been described in HIV-infected patients before the use of antiretroviral therapy [2-5].

The aim of this study is to investigate the influence of HIV infection on the serum osteocalcin levels. A cross-sectional study was performed on 69 HIV-infected patients [48 men, 21 women, mean age (SD) 33 years (+-4)] pre-antiretroviral therapy. Fifty healthy seronegative adults matched by age, and sex served as controls. To analyze the possible relation between the serum osteocalcin levels and disease severity, the HIV-infected group was classified according to CD4 cell count into three groups of 23 patients:

Group1 CD4 cell count ≥ 500 , Group 2 CD4 cell count in between 499-200, Group 3 CD4 cell count less than 199.

Osteocalcin levels were measured by an immunometric assay (DPC Corp., Los Angeles, CA) detecting intact osteocalcin (1-49) with a reference range of 3.1 - 13.7 ng/ml.

When comparing more than two groups, the Kruskal-Wallis test was used. If a significant difference was found, the Mann-Whitney U test (two tailed) was used to determine the differences between each pair of groups. Coefficients of correlation were calculated by the Spearman rank test. Data are given as medians and 25-75th percentiles, if not otherwise quoted. P values are two-sided and considered significant when $<0,05$.

The characteristics of the 119 subjects included in the study, and the results are summarized in Table 1.

Serum osteocalcin levels reduction was present in 43,5 % of HIV infected patients and in 16% of health controls [$P=0,0001$;odds ratio (OR) 4,04; 95% CI 1,68-9,69].

No statistical significance difference on osteocalcin levels were found in HIV-infected patients, irrespective of the CD4 cell count and viral load; however, serum osteocalcin concentration had a positive correlation with CD4 cell count [$r=0,067$; $P=0,587$], and a negative correlation with viral load [$r=-0,228$; $P=0,06$].

Tabela I. Characteristics of the 119 patients included in the study

	HIV-negative		HIV-positive	
	N=50	CD4 >500 N=23	CD4 200-499 N=23	CD4 <199 N=23
	30 +- 5	33 +- 5	33 +- 4	32 +- 4
7.1.1 Age (years)*				
Median Osteocalcin	3,9	3,0	2,9	2,5
Median CD4	N/T**	717	318	148
Median Viral load	N/A***	9600	31.000	160.000
% of subjects with reduced Osteocalcin levels	16	30,4	56,5	43,5

*Values are mean +- SD

**not tested

***not applicable

The HIV-infected patients in our series showed marked decrease in serum osteocalcin concentration compared with non-HIV patients.

Several studies have assessed biochemical markers of bone formation and resorption in HIV-infected patients, and their changes after therapeutic interventions with similar conclusions [7-9]. The hypothesis that osteoblasts could act on as local HIV-1 reservoirs, the systemic activation of T cells in vivo leads an osteoprotegerin ligand-mediated increase in osteoclastogenesis, and the hypothesis that osteopenia may result from mitochondrial toxicity may explain the interaction of HIV infection and alteration in bone mineral metabolism [2-9]. The lack of statistical significance differences in the osteocalcin levels and CD4 cell count, and viral load has the limitation of the relatively small population included in the study.

Decreased bone mineral density has previously been reported in HIV-infected patients [8], and although the clinical consequences of our findings with disturbed osteocalcin levels remain unclear, it is conceivable that if these abnormalities persist over time, they may well lead to clinically significant bone loss. Until more is known about the etiology of the alteration in bone mineral metabolism of HIV-positive persons, certain changes in lifestyle behaviors may contribute to optimal skeletal health.

REFERENCES

1. Midtby M, Magnus JH., Joakimsen RM. The Tromso Study: A population-based study on the variation in bone formation markers with age, gender, anthropometry and season in both men and women. *Osteoporos Int* 2001, 12:835-843.
2. Carr A, Miller J, Eisman JA., Cooper DA. Osteopenia in HIV-infected men: association with asymptomatic lactic acidemia and lower weight pre-antiretroviral therapy. *AIDS* 2001, 15:703-709.
3. Kuhne CA, Heufelder AE, Hofbauer LC. Bone and mineral metabolism in human immunodeficiency virus infection. *Journal of Bone and Mineral Research* 2001, 1:2-9.
4. Knobel H, Guelar A, Vallecillo G., Nogues X, Diez A. Osteopenia in HIV-infected patients: is it the disease or is it the treatment? *AIDS* 2001, 15:807-808.

5. Tebas P, Powderly WG, Claxton S, *et al.* Accelerated bone mineral loss in HIV-infected patients receiving potent anti-retroviral therapy. *AIDS* 2000, 14:F63-F67.
6. Kong YY, Penninger JM. Molecular control of bone remodeling and osteoporosis. *Exp Gerontol* 2000, 35:947-956
7. Nacher M, Serrano S, Gonzalez A, *et al.* Osteoblasts in HIV-infected patients: HIV-1 infection and cd4 function. *AIDS* 2001, 15:2239-2243.
8. Blankson JN, Persaud D, Siliciano RF. The challenge of viral reservoirs in HIV-1 infection. *Annu Rev Med* 2002, 53:557-593.
9. Teichmann J, Stephan E, Disher T, *et al.* Changes in calciotropic hormones and biochemical markers of bone metabolism in patients with Human Immunodeficiency Virus infection. *Metabolism* 2000, 49:1134-1139.

Anexo 2 – Dados da Performance do Teste de Osteocalcina

Comitê de Ética em Pesquisa CEPARH

Parecer No. 16/2002

Salvador, 30 de outubro de 2002.

O Comitê de Ética em Pesquisa do CEPARH – Centro de Pesquisa e Assistência em Reprodução Humana, em reunião realizada em 30 de outubro de 2002, avaliou o projeto para monografia do Dr. Antonio Carlos Silva Santos Júnior, “Avaliação do Marcador de Formação Óssea Osteocalcina de Indivíduos Portadores de Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo I e sua Correlação com Marcadores de Gravidade da Doença”

Por tratar-se de uma pesquisa na qual não há envolvimento de pacientes e os soros utilizados não possuem registro, nome ou endereço, o projeto foi aprovado sem restrições.


Dr^a Lúcia Pereira Nascimento
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa
CEPARH

Anexo 3 – Dados da Performance do Teste de Osteocalcina

Características do ensaio

Ver tabelas e gráficos para dados representativos da performance do doseamento. Os resultados são apresentados em ng/mL. (Salvo referência em contrário todos os dados foram obtidos de amostras de plasma heparinizado.)

Calibração: Até 100 ng/mL

Sensibilidade Analítica: 0,1 ng/mL

Efeito Hook de Alta Dose:

Nenhum até 25 000 ng/mL.

Precisão: As amostras foram doseadas em duplicado durante 20 dias, 2 ensaios por dia, perfazendo um total de 40 ensaios e 80 réplicas. (Ver a tabela de "Precisão".)

Linearidade: As amostras foram doseadas sob vários níveis de diluição. (Ver a tabela de "Linearidade" para dados representativos.)

Recuperação: As amostras foram adicionadas na relação de 1 para 19 com três soluções (60, 260 and 1500 ng/mL) antes do doseamento. (Ver tabela de "Recuperação" para dados representativos.)

Especificidade: O doseamento é específico para o osteocalcina (Ver tabela de "Especificidade".)

Bilirrubina: Não apresenta efeito significativo.

Hemólise: Não apresenta efeito significativo.

Outros tipos de amostra: Sem efeito significativo. ($n = 28$.) Por regressão linear:

(Soro) = 0,98 (Heparina) + 0,35 ng/mL
(EDTA) = 0,94 (Heparina) + 0,94 ng/mL

Médias:

19,45 ng/mL (Heparin)

19,38 ng/mL (Serum)

19,31 ng/mL (EDTA)

$r = 0,992$

$r = 0,990$

Comparações de métodos: O ensaio foi comparado a outro ensaio comercial, imunoradiométrico, (Kit A), em 74 amostras de soro e plasma. (doentes e adicionadas.) (Zona de trabalho: aproximadamente 1,5 a 56 ng/mL. Ver gráfico.) Regressão linear:

(IML) = 1,2 (Kit A) - 0,38 ng/mL

$r = 0,990$

Tables and Graphs

Precision (ng/mL)

	Mean ³	Within-Run ¹		Total ²	
		SD ⁴	CV ⁵	SD	CV
1	0.84	0.025	3.0%	0.042	5.0%
2	1.52	0.043	2.8%	0.072	4.7%
3	2.81	0.078	2.8%	0.098	3.5%
4	6.92	0.194	2.8%	0.270	3.8%
5	14.1	0.388	2.8%	0.540	3.8%
6	39.4	1.38	3.5%	1.85	4.7%
7	87.6	3.94	4.5%	6.20	7.1%

Linearity (ng/mL)

	Dilution ¹	Observed ²	Expected ³	%O/E ⁴
1	16 in 16 ⁵	85	—	—
	8 in 16	33	33	100%
	4 in 16	18	16	100%
	2 in 16	8.5	8.1	105%
	1 in 16	4.5	4.1	110%
2	16 in 16	49	—	—
	8 in 16	23	25	96%
	4 in 16	13	12	103%
	2 in 16	6.3	6.1	103%
	1 in 16	3.2	3.1	105%
3	16 in 16	31	—	—
	8 in 16	16	16	100%
	4 in 16	7.6	7.8	97%
	2 in 16	4.0	3.9	103%
	1 in 16	2.0	1.9	105%
4	16 in 16	21	—	—
	8 in 16	10	11	91%
	4 in 16	5.4	5.3	102%
	2 in 16	2.6	2.6	100%
	1 in 16	1.3	1.3	100%
5	16 in 16	13	—	—
	8 in 16	6.4	6.5	98%
	4 in 16	3.2	3.2	100%
	2 in 16	1.5	1.6	94%
	1 in 16	0.8	0.8	100%

IMMULITE Osteocalcin

Recovery (ng/mL)

	Solution ¹	Observed ²	Expected ³	%O/E ⁴
1	—	4.7	—	—
	A	8.2	7.5	109%
	B	18.1	17.5	103%
	C	95.8	79.5	121%
2	—	5.3	—	—
	A	8.3	8.0	104%
	B	17.6	18.0	99%
	C	94.8	80.0	119%
3	—	7.1	—	—
	A	9.4	9.7	97%
	B	19.9	19.7	101%
	C	80.4	81.7	98%
4	—	10.9	—	—
	A	13.3	13.4	99%
	B	24.2	23.4	103%
	C	96.1	85.4	113%

Specificity

Compound ¹	Amount Added ²	% Cross-reactivity ³
Osteocalcin fragment 1-43	1000 ng/mL	ND
HSA	3000 ng/mL	ND
Transferrin	4.0 mg/mL	ND
Ferritin	100 µg/mL	ND
hIgG	100 µg/mL	ND
AFP	400 IU/mL	ND

ND: not detectable.⁴

Method Comparison

