



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL**

**KALIENE MARIA ESTEVÃO LEITE**

**MEDIADORES INFLAMATÓRIOS E ASSOCIAÇÃO COM O ESPESSAMENTO  
CAROTÍDEO EM PESSOAS COM HIV/AIDS, EM USO DE ANTIRRETROVIRAIS E  
COM BAIXO RISCO CARDIOVASCULAR**

**RECIFE-PE**

**2017**

**KALIENE MARIA ESTEVÃO LEITE**

**MEDIADORES INFLAMATÓRIOS E ASSOCIAÇÃO COM O ESPESSAMENTO  
CAROTÍDEO EM PESSOAS COM HIV/AIDS, EM USO DE ANTIRRETROVIRAIS E  
COM BAIXO RISCO CARDIOVASCULAR**

**ORIENTADORA:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Heloísa Ramos Lacerda de Melo

**CO- ORIENTADORA:** Prof. Dr<sup>ª</sup>. Adriana Ferraz de Vasconcelos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção de grau de mestre em Medicina Tropical.

**RECIFE-PE**

**2017**

Catálogo na fonte  
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

L533m Leite, Kaliene Maria Estevão.  
Mediadores inflamatórios e associação com o espessamento carotídeo em pessoas com HIV/AIDS, em uso de antirretrovirais e com baixo risco cardiovascular / Kaliene Maria Estevão Leite. – 2017.  
106 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Heloísa Ramos Lacerda de Melo.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Recife, 2017.  
Inclui referências e anexos.

1. HIV. 2. Inflamação. 3. Doença cardiovascular. 4. Terapia antiretroviral.  
I. Melo, Heloísa Ramos Lacerda de (Orientadora). II. Título.

618.9883            CDD (23.ed.)            UFPE (CCS2017-149)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)<sup>1</sup>

---

**KALIENE MARIA ESTEVÃO LEITE**

**MEDIADORES INFLAMATÓRIOS E ASSOCIAÇÃO COM ESPESSAMENTO  
CAROTÍDEO EM PESSOAS COM HIV/AIDS EM USO DE ANTIRRETROVIRAIS E  
COM BAIXO RISCO CARDIOVASCULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Medicina Tropical.

Aprovada em: 22/02/2017.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Vláudia Maria Assis Costa (Examinadora Interna)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Líbia Cristina Rocha Vilela Moura (Examinadora Interna)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Emmanuelle Tenorio Albuquerque Godoi Berenguer de Barros e Silva  
Universidade Federal de Pernambuco

---

<sup>1</sup> Endereço: Av. Prof. Moraes Rêgo, s/n – Bloco A – Térreo do Hospital das Clínicas da UFPE. CEP.: 50670-901, Cidade Universitária, Recife-PE - Brasil. Fone/Fax: (081) 2126.8527. Sítio: <http://www.ufpe.br/ppgmedtrop>

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**

**REITOR**

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

**PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

**DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Nicodemos Teles de Pontes Filho

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO**

**EM MEDICINA TROPICAL**

Valdênia Maria Oliveira de Souza

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO**

**EM MEDICINA TROPICAL**

Maria Amélia Vieira Maciel

**DOCENTES PERMANENTES**

Ana Catarina de Souza Lopes

Ana Lúcia Coutinho Domingues

Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

Fábio André Brayner dos Santos

Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Maria Amélia Vieira Maciel

Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

Marli Tenório Cordeiro

Rejane Pereira Neves

Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Valdênia Maria Oliveira de Souza

Vera Magalhães da Silveira

Vludia Maria Assis Costa

**DOCENTES COLABORADORES**

Líbia Cristina Rocha Vilela Moura

Virgínia Maria Barros de Lorena

Ao santíssimo Deus, a ele toda honra e toda glória.

A meus pais Antonio e Ilene, por serem os melhores pais que eu poderia ter, é principalmente por eles todo meu esforço.

Aos meus irmãos Odirlei e Amanda, Por serem meus pilares quando preciso.

Ao meu namorado Higor, por todo amor que me dedica.

Aos familiares e amigos que me apóiam e torcem pelo meu crescimento.

## AGRADECIMENTOS

A Prof.Dr. Heloísa Ramos Lacerda de Melo, por acreditar e confiar na minha capacidade e por me ensinar a dar passos largos. Exemplo de pessoa e de profissional que servirá sempre como espelho para mim.

A Prof.Dr. Adriana Ferraz de Vasconcelos pela contribuição durante a realização prática e escrita do projeto. Sua disponibilidade e conhecimento foram essenciais.

A Prof.Dr. Emannuele Reis Godoi, pela realização dos exames de imagem e contribuição na construção da escrita do projeto. Seu exemplo de prestatividade, humildade, responsabilidade e profissionalismo servem de inspiração para que eu continue nessa caminhada. Obrigada por tudo.

A Prof.Dr. Virgínia Lorena, pela realização da citometria de fluxo, e por toda disponibilidade, orientação, dedicação e responsabilidade que teve na realização dos experimentos.

Aos profissionais do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, pela realização dos exames necessários, em especial a biomédica Leonilde, pelo comprometimento que teve em realizar junto comigo os exames de PRC-us.

Ao amigo e companheiro de pesquisa Gerson Gomes, sempre prestativo, disposto a me ensinar e contribuir para o meu crescimento.

A todos os funcionários do setor de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas, em especial Roque Almeida e Rosângela Souza, por serem tão prestativos, disponíveis e comprometidos com a pesquisa. Não tenho palavras para agradecer, muito Obrigada.

Aos amigos Ângela, Cássio e Marinalva, meu dia a dia no hospital era menos cansativo porque eles estavam presentes, meu carinho por eles é imenso.

As amigas e companheiras de mestrado, Mirela, Elisabeth e Renata por tornarem mais fácil a minha caminhada, com o carinho e disponibilidade sempre.

Aos docentes e funcionários da Pós- graduação em Medicina Tropical, em especial o secretário Walter Galdino por está sempre disposto a ajudar.

Aos membros da banca de defesa dessa dissertação, pela disponibilidade e por contribuir para uma melhor construção desse projeto.

A todos os pacientes que aceitaram participar da pesquisa, eles são os protagonistas e o motivo principal de buscarmos maiores avanços no mundo científico.

A todas as pessoas, que mesmo não citadas nominalmente, contribuíram de alguma forma, para que esta pesquisa pudesse ser realizada.

*“ Ter fé não significa estar livre de momentos difíceis, mas ter a força para enfrentá-los sabendo que não estamos sozinhos. ”*

*Papa Francisco*

## RESUMO

Os indivíduos com infecção pelo HIV estão em risco aumentado de desenvolver doença cardiovascular quando comparado com a população geral. Isso se deve a inflamação provocada pelo HIV, uso da terapia antirretroviral e fatores de risco tradicionais. Contudo poucos estudos observaram a ocorrência desses distúrbios na população de HIV positivos, considerada baixo risco cardiovascular e com carga viral indetectável. Deste modo o objetivo foi avaliar a associação entre os níveis dos mediadores inflamatórios com o espessamento carotídeo em pessoas vivendo com HIV, em tratamento com antirretrovirais (ITRN e ITRNN) e com baixo risco cardiovascular, além de comparar espessura mediointimal da carótida e níveis de mediadores inflamatórios entre pessoas com e sem o HIV. Para determinação do baixo risco cardiovascular, em ambos os grupos, HIV e não HIV foi utilizado cálculo através do score de risco de Framingham. Foi realizada dosagem de marcadores inflamatórios (IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , PCR-us, sVCAM-1 e sICAM-1) através da técnica de citometria de fluxo, assim como medidas de espessura mediointimal de carótida através de ultrassom Doppler. Entre os grupos houve diferença quando comparados os marcadores inflamatórios IFN- $\gamma$ , IL-1 e TNF- $\alpha$ . Observa-se um maior nível desses marcadores no grupo sem HIV. No grupo HIV, os fatores associados à alteração da medida da espessura do complexo médio intimal de carótida foi idade e tabagismo. No grupo sem o HIV a idade, maior nível de colesterol total e LDL se mostraram associados ao aumento da espessura da carótida. A partir do cálculo de P75, na análise multivariada nos pacientes HIV, houve associação significativa entre níveis de TNF- $\alpha$  e IL1- $\beta$  a uma maior chance de aterosclerose. Dessa forma, conclui-se que ambos os grupos apresentam risco semelhante de desenvolver doença cardiovascular. Alerta-se a importância do controle da carga viral nos pacientes HIV positivos somado à manutenção de parâmetros de risco cardiovascular sob controle, tais como tabagismo, diabetes, hipertensão e dislipidemia, assim como realização de exame de imagem na população HIV positiva com idade  $\geq 40$ .

**Palavras chave:** HIV. Inflamação. Doença cardiovascular. Terapia antirretroviral.

## ABSTRACT

Individuals with HIV infection are at increased risk of developing cardiovascular disease when compared to the general population. This is due to the inflammation caused by HIV, the use of antiretroviral therapy and traditional risk factors. However, few studies have observed the occurrence of these disorders in the HIV-positive population, considered low cardiovascular risk and with undetectable viral load. The objective was to evaluate the association between the levels of inflammatory mediators with carotid thickening in people living with HIV, in treatment with antiretrovirals (NRTIs and NNRTIs) and with low cardiovascular risk, in addition to comparing, in addition to comparing íntima-média thickness of carotid and mediator levels Inflammation among people with and without HIV. To determine the low cardiovascular risk, in both groups, HIV and non-HIV was calculated using the Framingham risk score. Inflammatory markers (IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , ss-CRP, sVCAM-1 and sICAM-1) were measured by flow cytometry as well as Carotid artery by Doppler ultrasound. Among the groups, there were differences when comparing the inflammatory markers IFN- $\gamma$ , IL-1 and TNF- $\alpha$ . A higher level of these markers is observed in the non-HIV group. In the HIV group, the factors associated with the change in the thickness of the mean intimal carotid complex were age and smoking. In the group without HIV age, higher total cholesterol and LDL levels were associated with increased carotid thickness. From the calculation of P75, in the multivariate analysis in HIV patients, there was a significant association between levels of TNF- $\alpha$  and IL1- $\beta$  at a higher chance of atherosclerosis. Thus, it is concluded that both groups present a similar risk of developing cardiovascular disease. The importance of viral load control in HIV-positive patients is added together with the maintenance of cardiovascular risk parameters under control, such as smoking, diabetes, hypertension and dyslipidemia, as well as image examination in the HIV positive population aged  $\geq 40$ .

**Keywords:** HIV. Inflammation. Cardiovascular disease. Antiretroviral Therapy.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Inflamação provocada pelo HIV e ativação de células endoteliais	.....	23
<b>Figura 2.</b> Fatores determinantes da DCV em indivíduos infectados pelo HIV	.....	27
<b>Figura 3.</b> Parede arterial saudável (A). Aumento de células imunes, marcadores da inflamação e formação de placa aterosclerótica (B)	.....	31

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Comparação entre os grupos de pacientes HIV e não HIV quanto a características biológicas, fatores de risco para doença cardiovascular, mediadores inflamatórios, medidas de EMI e fatores relacionados ao HIV	.....	50
<b>Tabela 2.</b> Associação dos fatores relacionados à espessura mediointimal carotídea estratificados segundo a condição de infecção pelo HIV	.....	51
<b>Tabela 3.</b> Associação dos fatores relacionados à espessura mediointimal carotídea, em análise multivariada, estratificados segundo a condição de infecção pelo HIV	.....	52

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

3TC	Lamivudina
AAS	Ácido Acetil Salicílico
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AZT	Zidovudina
CCD	Carótida Comum Direita
CCE	Carótida Comum Esquerda
CNPQ	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
DCV	Doença Cardiovascular
EFZ	Efavirenz
EMI	Espessura Mediointimal
ERF	Escore de Risco de Framingham
FIOCRUZ	Fundação Instituto Oswaldo Cruz
HCV	Vírus da Hepatite C
HDL	High Density Lipoprotein
HIV	Human Immunodeficiency virus
IAM	Infarto Agudo do Miocárdio

IFN- $\gamma$	Interferon gama
IFN- $\alpha$	Interferon alfa
IL	Interleucina
IL-1 $\beta$	Interleucina 1beta
IPs	Inibidores de protease
ITRN	Inibidor da Transcriptase reversa Análogo de nucleosídeo
ITRNN	Inibidor da Transcriptase Reversa Não Análogo de Nucleosídeo
LDL	Low Density Lipoprotein
NK	Natural Killer
NVP	Nevirapina
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR-us	Proteína C Reativa Ultrassensível
PVHA	Pessoas Vivendo com HIV/Aids
SBACV	Sociedade Brasileira de Angiologia e cirurgia Vascular
sICAM-1	Molécula de Adesão Intercelular Solúvel 1
SL	Síndrome da Lipodistrofia
sVCAM-1	Molécula de Adesão Vascular Solúvel 1
TARV	Terapia Antirretroviral Altamente Ativa
TDF	Tenofovir
TG	Triglicerídeos
TNF $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	18
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	20
2.1. Base histórica	21
2.2. Infamação provocada pelo HIV	22
2.3. TARV, Dislipidemia e Risco Cardiovascular	25
2.4. Alteração dos Biomarcadores da inflamação e aterosclerose	27
2.5. Escore de risco de Framingham	31
<b>3. OBJETIVOS</b>	33
3.1. Objetivo Geral	34
3.2. Objetivos Específicos	34
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	35
4.1. Desenho do Estudo	36
4.2. População e Local do Estudo	36
4.3. Critérios de Inclusão e Exclusão	36
4.3.1. Critérios de Inclusão dos Pacientes com HIV	36
4.3.2. Critérios de Exclusão dos Pacientes com HIV	37
4.4. Coleta de Dados	37
4.5. Critérios de Inclusão, Exclusão, Coleta de Dados e Retorno para Inclusão dos Pacientes sem HIV	37
4.6. Coleta das Amostras de Sangue	37

4.7.	Lipidograma e Dosagem dos Biomarcadores da Inflamação	.....	38
4.8.	Medições da Espessura Mediointimal de Carótida (EMI)	.....	38
4.9.	Varáveis	.....	39
4.9.1.	Variáveis Independentes	.....	39
4.9.2.	Variáveis Dependente	.....	39
4.10.	Análise Estatística	.....	39
4.11.	Considerações Éticas	.....	40
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b>	.....	41
	Mediadores inflamatórios e associação com o espessamento carotídeo entre pessoas vivendo com HIV, em uso de antirretrovirais e com baixo risco cardiovascular	.....	42
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	.....	56
	<b>REFERÊNCIAS</b>	.....	58
	<b>APÊNDICE</b>	.....	69
	<b>APÊNDICE A-</b> Versão do artigo em Inglês	.....	70
	<b>APÊNDICE B-</b> Formulário de inclusão de pacientes	.....	85
	<b>APÊNDICE C-</b> Formulário primeira consulta	.....	87
	<b>APÊNDICE D-</b> Ficha de registro de resultados de exames de imagem	.....	88
	<b>APÊNDICE E-</b> Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	.....	89
	<b>ANEXOS</b>	.....	94
	<b>ANEXO A-</b> Parecer da Comissão de Ética em Pesquisa do Centro de Ciência da Saúde- UFPE	.....	95
	<b>ANEXO B-</b> Normas de submissão à revista BMC Infectious Diseases	.....	99

## ***INTRODUÇÃO***

## 1. INTRODUÇÃO

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Aids) e a infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) são um problema de saúde pública internacional, por sua complexidade e influência em diversos aspectos da vida social, apresentando contornos particulares em cada contexto no qual se dissemina (KALICHMAN *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2009). Foi reconhecida em meados de 1981, nos EUA, a partir da identificação de um número elevado de pacientes adultos do sexo masculino, homossexuais e moradores de San Francisco, que apresentaram “sarcoma de Kaposi”, pneumonia por *Pneumocystis carinii*, comprometimento do sistema imune, os quais se sabe hoje que são características típicas da Aids (BRASIL, 2006). Sendo responsável por mudanças significativas em outros campos que não somente a saúde, principalmente por combinar comportamento sexual e doença, a Aids acarretou desafios para a área científica e atinge as pessoas em proporção geométrica, sem distinção social, econômica, racial, cultural ou política (GALVÃO *et al.*, 2000, PINTO *et al.*, 2007).

Estudos mostram que o risco tanto de infarto do miocárdio como da doença cerebrovascular é 40% a 70% maior entre indivíduos infectados pelo HIV do que entre indivíduos não infectados, com a mesma idade e sexo (CHOW *et al.*, 2012; FREIBERG *et al.*, 2013). Apesar de que alguns medicamentos da terapia antirretroviral (TARV) aumentam o risco de doença cardiovascular (DCV), o risco elevado nesta população parece ser mediado em maior parte pela própria infecção. Estudos demonstraram um risco aumentado de eventos cardiovasculares entre aqueles que descontinuem a TARV e naqueles com cargas virais detectáveis (EL-SADR *et al.*, 2006; FREIBERG *et al.*, 2013). O risco de doença aterosclerótica entre indivíduos infectados pelo HIV é aumentado pela ativação imune e inflamação crônica, que permanecem anormalmente elevadas entre os infectados mesmo após a supressão viral (HUNT *et al.*, 2008).

A progressão do HIV leva à imunossupressão, a replicação contínua do vírus provoca um estado de ativação imunológica generalizada, refletido pela carga viral, provocando aumento de citocinas inflamatórias como fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina (IL) -6, bem como biomarcadores inflamatórios, como neopterin e solubilidade a receptores de fator de necrose tumoral (SCHROECKSNADEL *et al.*, 2012). A inflamação induzida pelo vírus também está associada a níveis de circulação aumentados de biomarcadores de ativação endotelial tais como molécula de adesão intracelular (sICAM) e molécula de adesão celular vascular (sVCAM) que são secretadas pelo endotélio lesionado. Estas moléculas de adesão desempenham um papel essencial no desenvolvimento da

inflamação vascular e disfunção endotelial, que estão associadas à patogênese da doença cardiovascular (CALZA *et al.*, 2009).

A terapia antirretroviral adequada tornou o HIV uma doença crônica e, com a doença controlada, a expectativa de vida dos indivíduos Infectados pelo HIV aproxima-se da população não infectada. No entanto, o uso prolongado da TARV predispõe dislipidemia, hiperglicemia e lipodistrofia, entre outros efeitos colaterais, aumentando o risco relativo de DCV (SAMJI *et al.*, 2013). Alguns estudos sugerem associação entre a classe de drogas, inibidores da protease (IPs) e eventos cardiovasculares, que podem ser atribuído são efeito proaterogênico destes agentes sobre os lipídios (CURRIER *et al.*, 2008). Em contraste, o IP, atazanavir é associado a perfis lipídicos melhorados, já o IP ritonavir tem sido associado à progressão da espessura mediointimal (EMI) da carótida, um marcador para risco cardiovascular (CAREY *et al.*, 2010; DEKKER *et al.*, 2011).

Dessa forma, tornou-se evidente a importância de investigar a associação entre os níveis dos mediadores inflamatórios (Interferon gama (IFN- $\gamma$ ), IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , proteína c reativa ultrasensível (PCR-us), sVCAM-1 e sICAM-1) com o espessamento carotídeo em pessoas vivendo com HIV, em tratamento com antirretrovirais (ITRN e ITRNN) e com baixo risco cardiovascular. Além de comparar medida da espessura mediointimal da carótida e níveis de mediadores inflamatórios, entre pessoas com e sem o HIV.

***REVISÃO DE LITERATURA***

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1.BASE HISTÓRICA

A grande maioria das pessoas que vivem com o vírus HIV está em países de baixa e média renda. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a África subsaariana é a região mais afetada, com 25,6 milhões de pessoas vivendo com HIV em 2015. Taxas de novas infecções por HIV em adultos ficaram relativamente estáveis na América Latina e no Caribe, Europa Ocidental e Central, América do Norte, Oriente Médio e Norte da África. No entanto, o número anual de novas infecções por HIV na Europa Oriental e na Ásia Central aumentou em 57%. Estima-se que 35 milhões de pessoas morreram de doenças relacionadas com a Aids desde o início da epidemia, incluindo 1,1 milhões em 2015 (UNAIDS, 2016).

Desde o início da epidemia de Aids no Brasil até junho de 2014, foram registrados no país 757.042 casos da doença, sendo 491.747 (65,0%) casos em homens e 265.251(35,0%) em mulheres. A maior concentração dos casos no Brasil está entre os indivíduos com idade entre 25 a 39 anos de ambos os sexos, entre os homens, essa faixa etária corresponde a 54,0% e entre as mulheres 50,3% do total de casos. A taxa de detecção de Aids no Brasil tem apresentado estabilização nos últimos dez anos, com uma média de 20,5 casos para cada 100 mil habitantes, também se observa estabilização da taxa na região Sul, com uma média de 31,1 casos para cada 100 mil habitantes. As regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste apresentam uma tendência linear de crescimento significativa, considerando o nível de significância de 5%, já a região Sudeste é a única que apresenta tendência de queda significativa nos últimos dez anos (BRASIL, 2014).

Depois da introdução da terapia antirretroviral, a Aids passou a ser considerada uma doença crônica que, se manejada e tratada de maneira adequada, diminui consideravelmente, a probabilidade de adoecimento e morte das pessoas vivendo com HIV/Aids (PVHA). Além disso, estudos recentes evidenciaram que o tratamento não só é eficaz para o controle da doença e melhoria da qualidade de vida, mas também para a diminuição da transmissão do vírus (COHEN *et al.*, 2011; WILSON *et al.*, 2008). Atualmente, os esforços para o controle da epidemia de HIV/Aids, no Brasil, estão concentrados no diagnóstico precoce da infecção e no tratamento das PVHA, bem como a implementação de intervenções de prevenção combinada. A estratégia de tratamento de PVHA como medida de prevenção requer não somente o diagnóstico oportuno da infecção,

como também o investimento na melhoria do cuidado contínuo desses indivíduos (MONTANER *et al.*, 2013). O estímulo à TARV para todas as pessoas infectadas pelo HIV, independentemente de seu estado imunológico é uma importante medida de saúde pública, uma vez que, além de impactar a morbidade e mortalidade, auxilia na diminuição da carga viral, reduzindo, assim, a transmissibilidade do vírus (BRASIL, 2013).

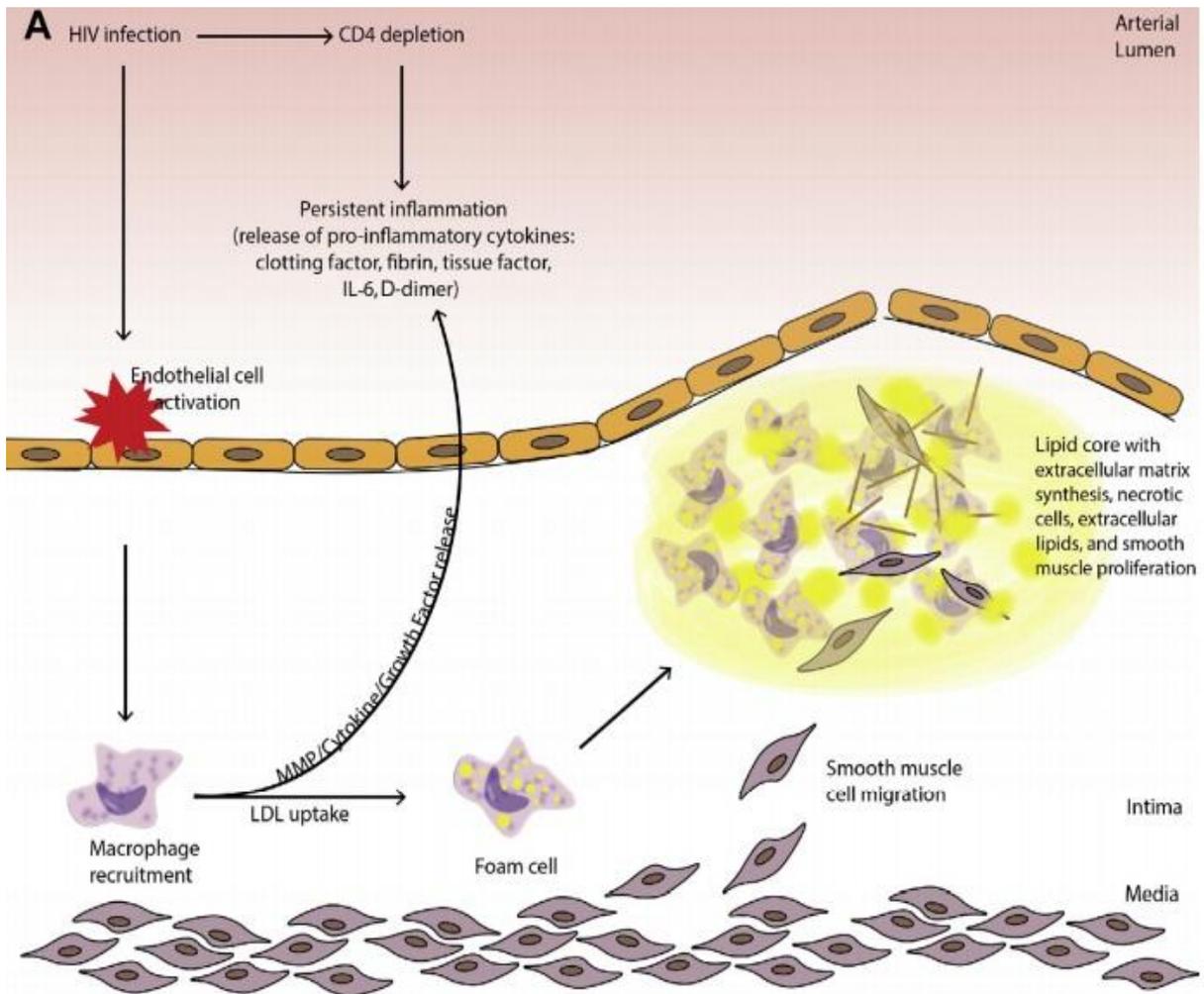
O uso da TARV para o combate da Aids é de extrema importância para a expectativa de vida dos portadores do vírus, graças ao enfraquecimento da replicação viral, ao fortalecimento do sistema imunológico e, conseqüentemente, à redução das infecções oportunistas (TROMBINI *et al.*, 2010). Entretanto, apesar da melhoria no prognóstico e na qualidade e expectativa de vida dos portadores do HIV, fatores como a potencial toxicidade dos fármacos a médio e longo prazo, problemas como dislipidemia, resistência insulínica, aumento de gordura intra-abdominal e perda de gordura periférica podem ocorrer em decorrência da TARV (CARR *et al.*, 2000; GUIMARAES *et al.*, 2008). O padrão dessas anormalidades metabólicas nos pacientes em uso de antirretrovirais é semelhante àquele presente na síndrome metabólica, a qual sabidamente aumenta o risco de doença cardiovascular aterosclerótica (GUIMARAES *et al.*, 2013).

## **2.2. INFLAMAÇÃO PROVOCADA PELO HIV**

A infecção pelo HIV pode aumentar o risco cardiovascular através de vários mecanismos, como inflamação persistente, ativação imune, dano endotelial, aumento da atividade trombótica, maior estresse oxidativo e desordens metabólicas indiretas. O HIV leva à ativação de diversas vias inflamatórias, causando a liberação de citocinas e expressão endotelial de moléculas de adesão que facilitam a adesão e a transmigração de leucócitos (FISHER *et al.*, 2006). Há uma estreita relação entre disfunção endotelial, inflamação e ativação imunológica, onde várias citocinas induzem ativação endotelial e alteram a sua funcionalidade. Adicionalmente, o HIV produz dano celular endotelial direto, aumentando a permeabilidade endotelial, favorecendo apoptose e aumentando a expressão de moléculas de adesão como E-selectina, VCAM-1 e ICAM-1 (REN *et al.*, 2002; EUGENIN *et al.*, 2008).

A ativação de células endoteliais induzida pelo HIV resulta no recrutamento de monócitos e na transformação de macrófagos no revestimento subendotelial. A liberação de mediadores pró-inflamatórios induzido pelo HIV contribui para a inflamação persistente. A proteína Nef do HIV facilita a captação por macrófagos de LDL (Low Density Lipoprotein), formando células de espuma. Eventualmente, a apoptose de células de espuma forma um núcleo necrótico rico em colesterol, e metaloproteinases da matriz (MMPs) são liberadas por

macrófagos criando uma placa instável que é propensa a ruptura (BLOOMFIELD e LEUNG *et al.*, 2017).



**Figura 1-** Inflamação provocada pelo HIV e ativação de células endoteliais (BLOOMFIELD e LEUNG *et al.*, 2017).

Proteínas relacionadas ao HIV contribuem para o aumento da ativação e sinalização de endotelina 1, peptídeos produzidos pelo endotélio, que em altas concentrações contribuem para hipertensão arterial e doença cardíaca (WANG *et al.*, 2014). A disfunção das células endoteliais dentro dos vasos sanguíneos proporciona um ambiente favorável para o distúrbio cardiovascular. Várias células inflamatórias estão envolvidas no processo aterosclerótico, uma vez que a integridade do endotélio se torna comprometida. Monócitos, através da ingestão de lipídios e lipoproteínas, tornam-se macrófagos que eventualmente compreendem estrias de gordura. Alguns mediadores são importantes no início da DCV, incluindo monócitos, macrófagos e moléculas de adesão celular. Esses fatores liberam citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, incluindo a PCR, TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6, que contribuem para a manutenção e progressão de DCV (WILLERSON *et al.*, 2004).

A Infecção pelo HIV, ausente de tratamento, está associada com altos níveis de citocinas inflamatórias, como a IL-6 e TNF- $\alpha$ . Algumas citocinas têm seus níveis reduzidos após o início da TARV, indicando que a replicação do vírus influencia na resposta inflamatória. Porém, algumas citocinas permanecem elevadas, como IL-6 e PCR, mesmo após a introdução da TARV (GAY C *et al.*, 2011).

Além da imunossupressão e conseqüente diminuição da resposta inflamatória sistêmica provocada pelo HIV, à infecção promove profundas alterações da função endotelial, semelhante às encontradas na reação inflamatória subclínica da doença aterosclerótica difusa. Níveis elevados de fator de Von Willebrand são encontrados nessas duas situações e se correlacionam com níveis de citocinas pró-inflamatórias. O estado de hipercoagulabilidade é diretamente proporcional à viremia. É preciso salientar que a expressão da proteína S também está diminuída e que a produção de autoanticorpos pró-trombóticos antifosfolipídicos está aumentada nesses pacientes (SUDANO *et al.*, 2006).

Antes do uso da TARV, os pacientes infectados pelo HIV apresentavam alterações do metabolismo lipídico, caracterizadas pelo aumento de triglicérides e pela redução dos colesteróis total, LDL e HDL (High Density Lipoprotein). A redução do nível dessa fração do colesterol em soropositivos ocorre em função da estimulação da lipase endotelial e da fosfolipase A2 pelo processo inflamatório, bem como pelo impedimento à liberação do HDL por macrófagos infectados pelo HIV. Adicionalmente, a molécula de HDL, na hipertrigliceridemia, fica repleta de triglicérides e, por essa razão, torna-se um substrato para a lipase hepática. Essa redução contribui para o processo aterosclerótico devido às suas funções antioxidantes e antiinflamatórias (GUIMARAES *et al.*, 2013).

A dislipidemia associada ao HIV é similar à observada em outras infecções virais crônicas. Níveis elevados de IFN- $\alpha$ , em fases avançadas da afecção, correlacionam-se com o aumento da dosagem de triglicérideo, devido a uma diminuição do “clearance” de lipoproteínas ricas desse nutriente. De modo semelhante, níveis elevados de fator TNF- $\alpha$ , principalmente na ocorrência de uma infecção oportunista, interferem no metabolismo de ácidos graxos, na oxidação lipídica e na inibição da supressão da lipólise mediada pela insulina, provocando, desta forma, hipertrigliceridemia (HEGELE *et al.*, 2007).

Alterações somáticas e metabólicas como lipodistrofia ou lipoatrofia que ocorrem em indivíduos infectados pelo HIV têm sido associadas a um risco aumentado de DCV, especialmente a doença arterial coronariana e acidente vascular cerebral. Estudos relatam níveis reduzidos de HDL e apolipoproteína A-I em indivíduos infectados pelo HIV como os principais fatores de risco de DCV devido alterarem o metabolismo lipídico. Essas alterações

ocorrem mesmo em indivíduos assintomáticos com contagens de CD4 acima de 400 células / mm<sup>3</sup> (ADEWOLE *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2013).

Os pacientes com infecção pelo HIV têm taxas mais elevadas de DCV do que a população em geral (CURRIER *et al.*, 2008). São mais acometidos com eventos cardiovasculares clínicos (doença cardíaca coronária e doença arterial periférica), e dano cardiovascular subclínico, elevação da espessura íntima-média da carótida, calcificação coronariana, índice tornozelo-braço anormal, isquemia miocárdica silenciosa, ou disfunção endotelial (LORENZ *et al.*, 2008; KINGSLEY *et al.*, 2008; ISLAM *et al.*, 2012). Além disso, a incidência de acidente vascular cerebral isquêmico na população infectada pelo HIV é consideravelmente elevada, especialmente em adultos jovens (OVBIAGELE *et al.*, 2011; SEM *et al.*, 2012).

### **2.3. TARV, DISLIPIDEMIA E RISCO CARDIOVASCULAR**

A síndrome da lipodistrofia (SL) apresenta-se, atualmente, como um dos mais preocupantes problemas decorrentes da terapia antirretroviral de combate ao HIV. Caracteriza-se principalmente por alterações na distribuição da gordura corporal, como a perda de tecido subcutâneo periférico e aumento da gordura central, e por distúrbios metabólicos como a dislipidemia, resistência à insulina e homeostase anormal da glicose, o que pode contribuir para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e de diabetes mellitus (LAKE *et al.*, 2011).

As manifestações cardiovasculares da infecção pelo HIV sofreram expressivas alterações após a introdução da TARV, especialmente no Brasil, onde os medicamentos são fornecidos gratuitamente pela rede pública de saúde, proporcionando acesso de todos os pacientes ao tratamento, independentemente da classe social (GUIMARAES *et al.*, 2013). Inicialmente, o elevado risco cardiovascular observado em pacientes com HIV foi atribuído a alterações metabólicas associadas com a TARV, devido, sobretudo ao efeito de IPs, cuja introdução na prática clínica coincidiu com os primeiros relatos de casos de doença isquêmica do coração em pacientes com HIV. Essa relação entre DCV e TARV foi posteriormente confirmada em estudos (HENRY *et al.*, 1998; GALLET *et al.*, 1998).

Estima-se que a incidência de DCV prematuras aumente devido ao perfil de risco cardiovascular elevado e ao aumento da sobrevivência dos pacientes infectados com HIV. Estudo francês mostrou que as DCV são a quarta causa de morte (7%) entre os pacientes infectados pelo HIV. Por isso, a estimativa do risco cardiovascular e o manejo de fatores de risco para as DCV, em pacientes portadores do HIV, devem fazer parte da abordagem do tratamento desses

pacientes. O monitoramento dos efeitos metabólicos do tratamento apresenta-se assim como um desafio para os serviços de referência, exigindo abordagem por equipe multidisciplinar, envolvendo infectologistas, endocrinologistas, cardiologistas, nutricionistas, dentre outros (RIMOLO *et al.*, 2007).

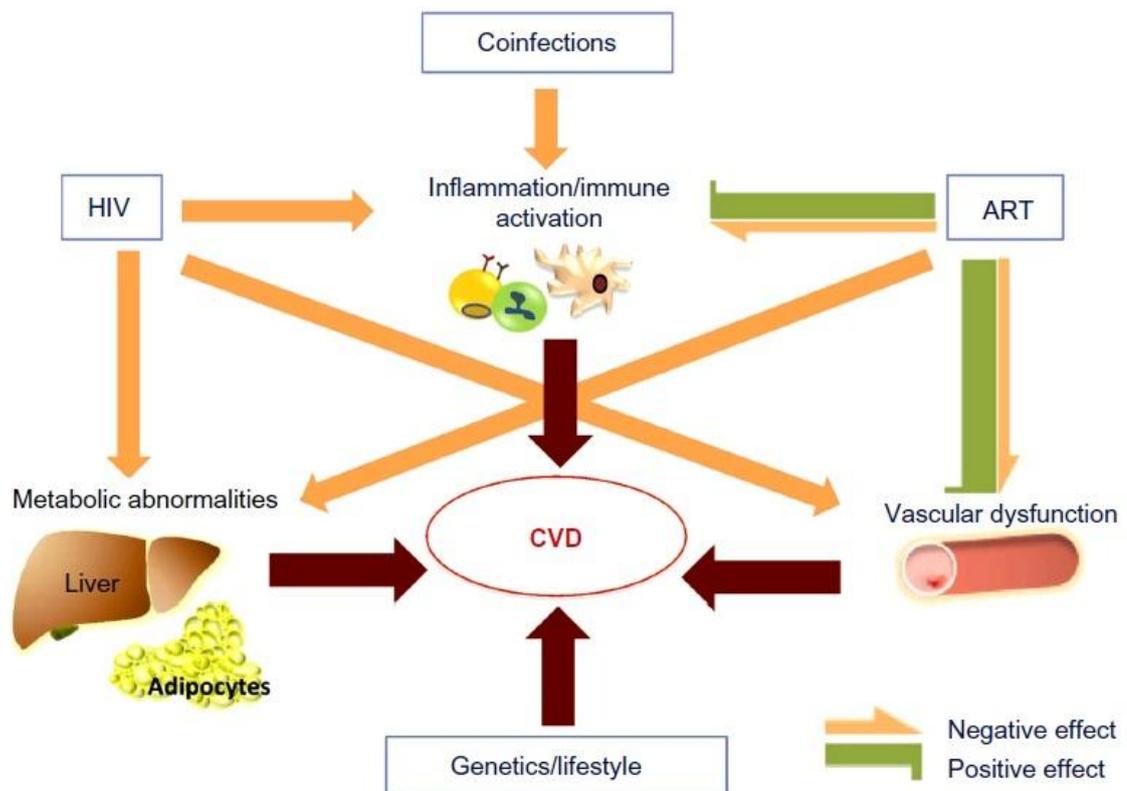
O aumento do risco cardiovascular associado à TARV tem sido atribuído aos efeitos metabólicos prejudiciais destas drogas, que favorecem o desenvolvimento de hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia, resistência à insulina e diabetes mellitus tipo 2 (HADIGAN *et al.*, 2001). Estas alterações podem ocorrer de forma independente ou como parte de outros distúrbios, tais como síndrome metabólica ou lipodistrofia. Em maior ou menor grau, o aparecimento destes eventos tem sido relatado em doentes tratados com drogas IPs e Inibidores da transcriptase reversa análogo de nucleosídeo (ITRN). Estas alterações dependem do tipo de fármaco administrado, já que fármacos que pertencem à mesma família podem ter efeitos diferentes, embora esses efeitos adversos tenham diminuído com a nova geração de drogas antirretrovirais (HEMKENS *et al.*, 2014). O início da TARV é geralmente associado com o aumento de lipídios plasmáticos (triglicédeos e colesterol total), com a elevação do LDL, e em menor escala, com o HDL, que, em parte, também poderia estar relacionada com o ganho de peso observado após o início da TARV (LAZZARETTI *et al.*, 2012).

Além disso, fatores de risco cardiovasculares tradicionais têm sido associados a uma maior e mais rápida progressão da espessura da camada íntima média da carótida em adultos infectados pelo HIV em uso de TARV (MERCIE *et al.*, 2002). Estudos realizados revelaram que alguns antirretrovirais, principalmente IPs e ITRNs, poderiam prejudicar a função endotelial, através do estresse oxidativo e inflamação, induzindo o aparecimento precoce de marcadores de senescência em células endoteliais e células mononucleares (CONKLIN *et al.*, 2003; LEFÈVRE *et al.*, 2010).

Em relação à classe dos IPs, o Ritonavir é a droga mais representativa, em relação aos distúrbios cardiovasculares. Quando combinado com Lopinavir, apresentam maior risco de DCV nessa população. Já o Atazanavir tem menor impacto no metabolismo lipídico (YOUNG *et al.*, 2005). Dentro do ITRN, os efeitos sobre os lipídios são modestos, o Tenofovir está associado a elevações mais baixas de colesterol total, LDL e triglicérides do que o Abacavir, apresentando efeito hipolipemiante. Entre os Inibidores da Transcriptase Reversa Não Análogo de Nucleosídeo (ITRNN), a Nevirapina está com melhor perfil lipídico que o Efavirenz. A utilização da Nevirapina reduz os níveis de colesterol total e triglicérides e promove um aumento da HDL e diminuição do risco aterogênico. Inibidores da Integrase, tais

como Raltegravir, Dolutegravir e Elvitegravir, têm um perfil lipídico neutro (POLO *et al.*, 2015).

O principal evento patogênico no infarto agudo do miocárdio (IAM) é a desestabilização da cobertura fibrosa da placa numa artéria coronariana com aterosclerose. A inflamação pode desempenhar um papel importante neste processo, tal como aumento da PCR, que é demonstrado como um fator de prognóstico para o desenvolvimento de um IAM (SOLAGES *et al.*, 2006; RIDKER *et al.*, 2011). Durante este processo inflamatório, a ativação do endotélio vascular e o sistema de coagulação dão importante contribuição para eventos cardiovasculares e a função endotelial alterada foi encontrada em vários estudos (ARILDSEN *et al.*, 2012).



**Figura 2-** Fatores determinantes da DCV em indivíduos infectados pelo HIV. (BELTRÁN *et al.*, 2015).

## 2.4.ALTERAÇÃO DOS BIOMARCADORES DA INFLAMAÇÃO E ATEROSCLEROSE

Na população em geral, estudos encontraram uma associação entre marcadores inflamatórios e espessamento mediointimal de carótida, enquanto que estudos examinando o papel da inflamação crônica como uma das causas do aumento no risco de doenças

cardiovasculares em pacientes com diabetes tipo 2 têm produzido resultados conflitantes (LEINONEN *et al.*, 2004; MOUSSAVI *et al.*, 2004; THAKORE *et al.*, 2007) . No entanto, o aumento dos níveis de marcadores inflamatórios e ocorrência de disfunção endotelial são evidentes em indivíduos infectados pelo HIV e pode ser correlacionada com o aumento de risco de DCV. Mesmo em pacientes que estão recebendo TARV, níveis de citocinas inflamatórias não normalizaram completamente, sugerindo que há uma inflamação contínua apesar do nível de vírus indetectável (TABIB *et al.*, 2000; ROSS *et al.*, 2008).

A ocorrência e progressão da DCV têm os macrófagos como um dos componentes principais no rompimento de placas de ateroma. Citocinas inflamatórias mantêm a instabilidade da placa evitando a formação de colágeno e destruição do colágeno existente (LIBBY *et al.*, 2006). Na lipodistrofia observada em indivíduos infectados pelo HIV, o tecido adiposo lipodistrófico se manifesta como uma alteração de citocinas segregadas com níveis aumentados de TNF- $\alpha$  e IL -6 (BARBARO *et al.*, 2009).

A aterosclerose caracteriza-se pela formação de placas na camada subendotelial, proliferação de células musculares lisas, acumulação de células imunes ativadas como monócitos e macrófagos e espessamento da camada adventícia no local da formação da placa. Várias células imunes estão normalmente presentes na parede arterial, porém seu número aumenta significativamente durante a progressão da aterosclerose (GALKINA *et al.*, 2006). As citocinas são produzidas por células T, monócitos, macrófagos e plaquetas, bem como por células endoteliais e adipócitos, em resposta à inflamação e outros estímulos (AIT-OUFELLA *et al.*, 2011)

Múltiplos marcadores de inflamação, ativação imunológica e disfunção endotelial estão associados com as DCV e têm sido estudados na população em geral e em portadores de HIV. Mediadores inflamatórios e moléculas de adesão como PCR-us, IL -6, TNF- $\alpha$ , sVCAM-1 e a s-ICAM-1 se encontram alteradas em estudos realizados nessa população (KURZ *et al.*, 2009; NEUHAUS *et al.*, 2010). Desregulação das citocinas, ativação dos macrófagos e das células da musculatura lisa promove aumento da formação de ateromas, fator agravante para a progressão de DCV (DAVIES *et al.*, 1993; HANSSON *et al.*, 2005).

Assim, a PCR-us prediz o risco de DCV e de várias causas de mortalidade na população com HIV (KULLER *et al.*, 2008; TRIANT *et al.*, 2009). Além disso, o TNF- $\alpha$  tem sido associado a eventos mórbidos não definidores da Aids, principalmente durante a TARV, incluindo a DCV (TENORIO *et al.*, 2014). Em doentes infectados pelo HIV, os níveis de sVCAM-1 têm sido associados com placas na camada íntima média da carótida, ao passo que os níveis de sVCAM-1 têm sido relacionado com o escore de cálcio coronário, os quais

são marcadores que se alteram na aterosclerose (LONGENECKER *et al.*, 2013; ROSS *et al.*, 2009).

Citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1, IFN- $\gamma$  e IL-10 podem afetar cada um dos processos do metabolismo lipídico, resultando em alterações nos níveis de circulação, principalmente, IL-1, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  parecem diminuir a atividade da lipoproteína lipase (ABERG *et al.*, 2009; MCLAREN *et al.*, 2011). As citocinas anti-inflamatórias IL-10 e IL-4 regulam a resposta imunitária pelos seus inibidoras e de forma semelhante, no metabolismo lipídico, a IL-4 inibe a estimulação da lipogênese hepática induzida pelas citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 ( TSAO *et al.*, 2014). A IL-10 também estimula a absorção de colesterol a partir de lipoproteínas modificadas facilitando a captação de colesterol a partir de lipoproteínas modificadas e sua transformação em células de espuma (HAN *et al.*, 2009; HAN *et al.*, 2010).

O TNF- $\alpha$  tem implicância na disfunção do miocárdio após síndromes coronarianas agudas, e tem se mostrado elevado em estudos com pacientes que sofreram recorrentes infartos do miocárdio ou morte cardíaca (RIDKER *et al.*, 2000). Também desempenha um papel fundamental no desenvolvimento da aterosclerose. É produzido por células T CD4 e células mielóides. A progressão da aterosclerose foi vista em estudos diretamente ligada ao aumento local na produção de TNF- $\alpha$  e com nível elevado no sangue (CANAULT *et al.*, 2008). O TNF- $\alpha$  leva a alterações nos níveis séricos de lipídios, afetando três funções vitais, a lipoproteína lipase do tecido adiposo, a lipólise e a síntese de ácidos graxos hepáticos (MCLAREN *et al.*, 2011).

A produção de IFN- $\gamma$  é especialmente elevada na placa aterosclerótica, onde promove resposta inflamatória por ativação de células Th1 (células CD4 +), células T citotóxicas (células CD8 +), e células natural killer (NK) (KOLTSOVA *et al.*, 2012; YOUNG *et al.*, 2002). O IFN- $\gamma$  foi mostrado por aumentar a expressão em macrófagos, facilitando assim a acumulação de LDL oxidado e formação de células de espuma (HARVEY *et al.*, 2005).

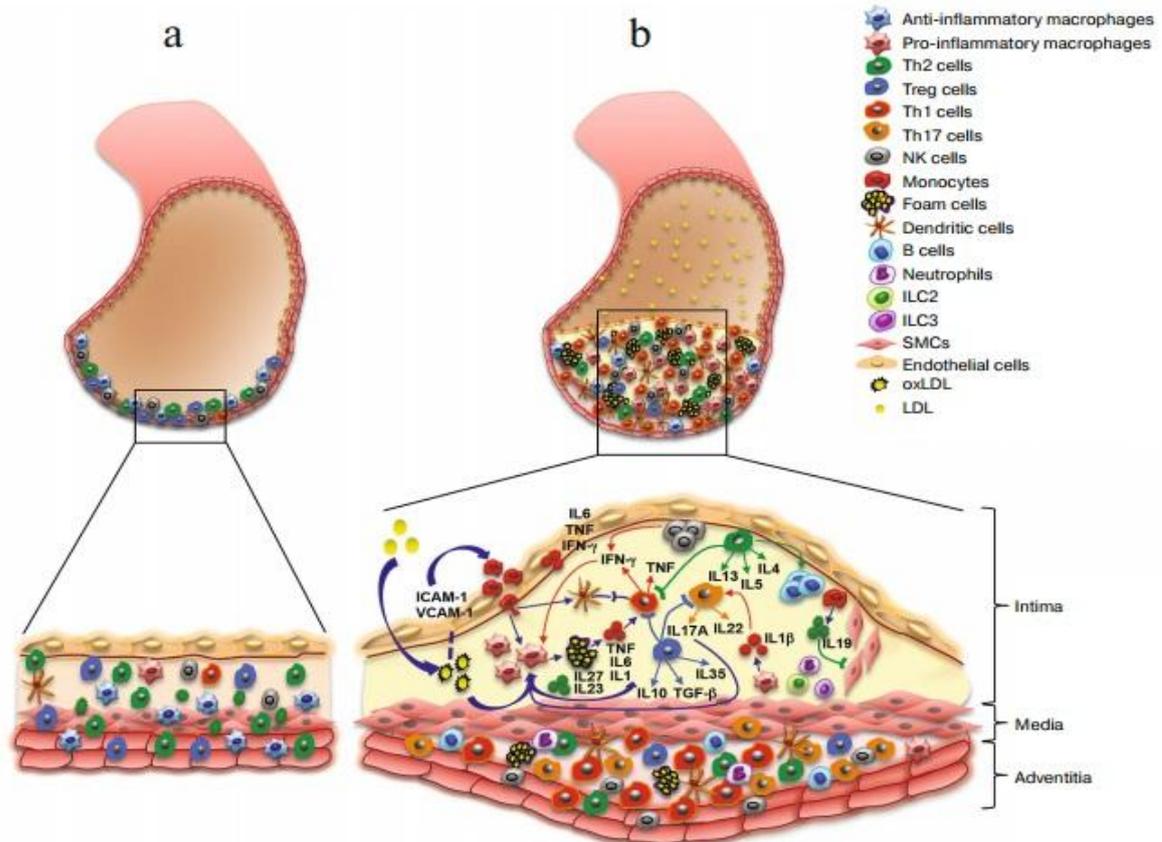
IL-1 $\beta$  é um fator essencial na diferenciação das células Th17 que pode exacerbar a inflamação na parede vascular. A IL-1 $\beta$  está envolvida na regulação da expressão de moléculas de adesão endotelial, bem como na ativação de macrófagos. A produção de IL-1 $\beta$  na aterosclerose depende da ativação do inflamassoma, que é um complexo protéico oligomérico implicado no sistema imunitário inato, causado por destruição lisossomal, por acúmulo de cristais de colesterol e de macrófagos (MILLS *et al.*, 2008; CLARKE *et al.*, 2010).

IL-6 é produzida por macrófagos, células T e adipócitos, e pode afetar diretamente as células endoteliais. Ela medeia o aumento da produção de superóxido e

disfunção endotelial (PIETROWSKI *et al.*, 2011; MATUSIK *et al.*, 2012). Na população geral, altos níveis de IL-6 estão bem estabelecidos como um marcador de eventos cardiovasculares e morte por qualquer causa (HSUE PY *et al.*, 2009; NORDELL *et al.*, 2014).

A PCR, uma proteína plasmática da família das pentraxinas é um reagente de fase aguda, que apresenta alta sensibilidade como marcador inflamatório, sendo um fator de risco independente para doença cardiovascular (DEVARAJ *et al.*, 2003). Estudos envolvendo esta molécula começaram há mais de uma década, associando estatisticamente o início de eventos coronarianos, como infarto do miocárdio com níveis séricos elevados dessa proteína. A partir deste ponto, pesquisas experimentais e epidemiológicas têm buscado a elucidação do efeito real e do poder preditivo da PCR na doença cardiovascular, tanto na prevenção primária como na secundária, como elemento a ser considerado nas equações para o cálculo de risco para doença cardiovascular (KOIKE *et al.*, 2009; DOGGEN *et al.*, 2000).

Moléculas de adesão sICAM-1 e as proteínas sVCAM-1 são expressas comumente em níveis baixos no organismo e são estimuladas por citocinas inflamatórias após estimulação imune, especificamente através da transcrição de TNF- $\alpha$ , IL-1 e fator nuclear kappa B. A VCAM-1 medeia a adesão de monócitos e linfócitos em áreas propensas a lesões e a ICAM-1 a detenção e a adesão das células ao endotélio (PACKARD *et al.*, 2008).



**Figura 3.** Parede arterial saudável (A). Aumento de células imunes, marcadores da inflamação e formação de placa aterosclerótica (B) (FATKHULLINAAR et al., 2016).

## 2.5. ESCORE DE RISCO DE FRAMINGHAM

O escore de risco de Framingham (ERF) estima a probabilidade de ocorrer infarto do miocárdio ou morte por doença coronária no período de 10 anos em indivíduos sem diagnóstico prévio de aterosclerose clínica. Embora esta estimativa de risco seja sujeita a correções conforme indicadores epidemiológicos da população estudada, o ERF identifica adequadamente indivíduos de alto, médio e baixo risco cardiovascular (RIDKER *et al.*, 2007). Assim como outros estudos similares, o ERF evidencia a confirmação dos fatores de risco clássicos para DCV como antecedentes pessoais, hipertensão, dislipidemia, tabagismo e diabetes, e dos fatores de risco adicionais como sedentarismo, obesidade associados à aterosclerose e suas manifestações clínicas. O Escore de risco de Framingham utiliza os seguintes parâmetros para cálculo do Risco: Sexo, Idade, níveis de colesterol total e colesterol HDL, pressão arterial sistólica e tabagismo. O risco é considerado baixo quando o escore é inferior a 10% para o paciente apresentar doença cardiovascular em 10 anos. Portanto: Baixo

risco <10%, Risco Intermediário entre 10% a 20% e Alto Risco >20% (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2007).

***OBJETIVOS***

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Avaliar a associação entre os níveis dos mediadores inflamatórios com espessamento carotídeo entre pessoas vivendo com HIV, em tratamento com antirretrovirais e com baixo risco cardiovascular. Além de comparar níveis dos mediadores inflamatórios e medidas da espessura mediointimal da carótida entre pessoas vivendo com e sem o HIV.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- 3.2.1. Dosar os níveis dos mediadores inflamatórios (IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , PCR-us, sVCAM-1 e sICAM-1).
- 3.2.2. Avaliar medida da espessura mediointimal de carótida.
- 3.2.3. Avaliar os níveis dos mediadores inflamatórios associando com espessamento mediointimal da carótida.
- 3.2.4. Comparar EMI e dosagem dos mediadores inflamatórios dos pacientes vivendo com HIV aos de pessoas vivendo sem o vírus.

## ***MATERIAIS E MÉTODOS***

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Desenho do Estudo**

Estudo Transversal, analítico, foi realizado no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco/ Recife-PE, Brasil. Foi descrita a associação entre mediadores inflamatórios e espessamento carotídeo na população de pacientes vivendo com HIV em uso de antirretrovirais e com baixo risco cardiovascular. Além comparar níveis dos biomarcadores inflamatórios e medidas da espessura mediointimal da carótida entre pessoas vivendo com e sem o HIV. A pesquisa fez parte de um projeto maior desenvolvido pelo mesmo grupo de pesquisa.

### **4.2. População e Local do Estudo**

Foram recrutados pacientes atendidos no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, localizado na cidade do Recife-PE, Brasil. Foi utilizada uma amostra de conveniência de 115 pacientes, sendo 99 indivíduos com HIV e 16 sem o HIV. Os pacientes com HIV faziam parte do Serviço de Atendimento Especializado em HIV/AIDS do Hospital, e os indivíduos sem o HIV eram acompanhantes de pacientes atendidos no serviço de Urologia do hospital. Além do diagnóstico de infecção pelo HIV, os pacientes com o vírus deveriam está em uso de esquema com 2 ITRN + 1 ITRNN, iniciado em qualquer momento a partir do seu diagnóstico. Os pacientes que utilizaram, em algum momento, esquemas antirretrovirais diferentes dos citados acima, não foram incluídos. Isso permitiu maior pureza quanto a possíveis efeitos metabólicos, causados pelas classes de antirretrovirais citadas.

### **4.3. Critérios de Inclusão e Exclusão**

#### **4.3.1. Critérios de Inclusão dos Pacientes com HIV**

Idades entre  $\geq 18$  e  $\leq 60$  anos, de ambos os sexos, que estivesse em uso de antirretroviral com esquemas que utilizassem 2ITRN + 1 ITRNN, iniciado a qualquer momento (a partir de histórico em prontuário), com carga viral indetectável e com baixo risco para doença cardiovascular, calculado pelo Escore de Risco de Framingham (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2007). O ERF estima a probabilidade de ocorrer infarto do miocárdio ou morte por doença coronária no período de 10 anos em indivíduos sem diagnóstico prévio de aterosclerose clínica. Utiliza para o cálculo de risco, parâmetros como Sexo, Idade, níveis de colesterol total e colesterol HDL, pressão arterial sistólica e tabagismo.

#### **4.3.2. Critérios de Exclusão dos Pacientes com HIV**

Histórico de internação hospitalar e/ou infecções oportunistas nos últimos 90 dias, disfunção tireoidiana, doença auto-imune, histórico de hepatite B ou C, gravidez ou amamentação, uso prévio de estatinas, fibratos, AAS, antiinflamatórios, anticoagulantes orais, interferon, interleucinas, hormônio do crescimento, imunoglobulinas, glicocorticoides (inclusive os de uso intranasal) ou outros imunossupressores, abuso de álcool, trauma muscular recente ou cirurgia realizada até 4 meses anteriormente, histórico de doença cardiovascular, diabetes, câncer e disfunção renal.

#### **4.4. Coleta de Dados**

Foram explicados aos pacientes os objetivos, riscos, benefícios e direitos de participar ou não da pesquisa. Todos aqueles que preencheram os critérios de inclusão e que aceitaram participar do estudo assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Os dados foram coletados no momento em que o paciente aceitou participar da pesquisa, e no retorno do paciente para realização das medidas de EMI e coleta de sangue, utilizando-se um formulário padronizado.

#### **4.5. Critérios de Inclusão, Exclusão, Coleta de Dados dos Pacientes sem HIV**

Todos os processos metodológicos realizados para a inclusão dos pacientes sem HIV foram similares a inclusão dos pacientes com HIV, excluindo apenas aqueles relacionados à presença do vírus. Foi realizado questionário similar ao do grupo HIV, sendo retiradas apenas as perguntas relacionadas ao vírus, também foi realizado cálculo através do Escore de Risco de Framingham para a definição do baixo risco cardiovascular.

#### **4.6. Coleta das Amostras de Sangue**

As amostras de sangue foram coletadas após jejum de 12 horas, utilizando-se agulhas e seringas descartáveis. Para a realização de todos os procedimentos, o profissional utilizou luvas descartáveis. Logo após a coleta, um tubo seco era levado ao laboratório do Hospital das Clinica da UFPE, para realização das dosagens bioquímicas (Colesterol total e frações) enquanto o outro era levado ao laboratório Aggeu Magalhães-CPqAM- (FIOCRUZ-PE) e centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos para separar o soro. Cada amostra de soro foi dividida em alíquotas e acondicionadas em micro tubos identificados com o código de identificação do paciente na pesquisa. As alíquotas foram armazenadas num freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ , no laboratório Aggeu Magalhães- CPqAM- (FIOCRUZ-PE). Concluída a coleta de todas as

amostras, foram realizadas as dosagens dos biomarcadores da inflamação, que ocorreu no mesmo laboratório onde as amostras estavam armazenadas.

#### **4.7. Lipidograma e Dosagem dos Mediadores Inflamatórios**

As amostras de sangue coletadas foram usadas para dosar lipidograma (colesterol total e frações e triglicerídeos) e os níveis dos mediadores inflamatórios (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, PCR-us, sVCAM-1 e sICAM-1). As dosagens de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, sVCAM-1 e sICAM-1 foram realizadas pelo método Cytometric Bead Array (CBA), os soros e os padrões de marcadores do kit foram incubados com microesferas de captura recobertas com anticorpos específicos para os marcadores e com o anticorpo de detecção marcado com ficoeritrina (PE), que fornece um sinal fluorescente na proporção da quantidade do analito ligado. Após as incubações foi acrescentado 1 ml da solução de lavagem e centrifugado por 10 minutos a 1100 rpm. O sobrenadante foi desprezado e com 300  $\mu$ l da solução de lavagem, as amostras foram ressuspensas para as dosagens em citômetro de fluxo, sendo os resultados gerados em formato de gráfico e tabular utilizando o BD CBA Software FCAP Array, versão 3.01. O método Cytometric Bead Array (CBA) foi realizado no laboratório do Instituto Aggeu Magalhães- FIOCRUZ-PE. A PCR-us foi dosada pela técnica de Imunoturbidimetria em látex, em que a proteína C reativa reage com o anticorpo específico formando imunocomplexos insolúveis. A Imunoturbidimetria e o lipidograma foram realizados no Laboratório do Hospital das Clínicas da UFPE.

#### **4.8. Medições da espessura mediointimal de carótida (EMI)**

As medidas de EMI foram realizadas usando aparelho de ultrassom marca GE, modelo LOGIQe BT12. O aparelho dispõe do software DICOM 3.0 e Auto IMT, com imagem automática, bem monitorada. Os pacientes foram avaliados entre 7:00-09:00 horas, após 12 horas de jejum. Todos os exames foram realizados por duas examinadoras, sendo duas médicas cirurgiãs vasculares qualificadas com título de Especialista em Ecografia Vascular pela Sociedade Brasileira de Angiologia e Cirurgia Vascular (SBACV). Foi realizada a medida na parede posterior do vaso estudado, em área livre de placa, e foi definida como sendo a distância entre duas linhas ecogênicas representadas pela interface lúmen-íntima e média-adventícia da parede arterial. A média da medida automática da carótida comum mais espessada foi definida como referência, seja ela direita (CCD) ou esquerda (CCE). A EMI foi considerada espessada se  $EMI > 0,61$ , a partir do calculado de percentil 75 da população estudada. O cálculo de percentil 75 é realizado para cada população a ser estudada, já que se

baseia no sexo, raça e idade do paciente. Foi tomada como base para esse cálculo a tabela de medidas de EMI do estudo Elsa-Brasil. Foi considerado presença de placa quando demonstrado um espessamento do EMI  $> 1,5\text{mm}$  (FREIRE et al., 2015; GODOI et al., 2012; GODOI, et al 2013). Resumidamente, os pacientes foram posicionados em decúbito dorsal, em uma posição confortável, em seguida foi medido o diâmetro da camada íntima média da carótida, de ambos os lados, direito e esquerdo.

#### **4.9. Variáveis**

##### **4.9.1. Variáveis independentes:**

- Vírus HIV (presença ou ausência do vírus)
- Alteração dos marcadores Inflamatórios (IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , PCR-us, sVCAM-1 e sICAM-1)
- Gênero (Masculino/ feminino)
- Idade ( $< 40$  ou  $\geq$  anos)
- Tabagismo (sim/não)
- Dislipidemia (alteração de colesterol total, HDL, LDL e triglicérideo)
- Diabetes ( sim/não)
- Tempo de terapia antirretroviral ( $> 5$  anos, entre 5 e 10 anos, mais que 10 anos de tratamento)

##### **4.9.2. Variável dependente:** Espessamento mediointimal da carótida.

#### **4.10. Análise estatística**

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software STATA, versão 11.0. Em todos os testes, o nível de significância adotado foi  $p \leq 0,05$ . As variáveis qualitativas foram expressas através das frequências absolutas e relativas, e quantitativas através das estatísticas descritivas, tais como: média, desvio padrão, mediana, percentil 25 e 75, sendo aplicado o teste t de student. Para os testes de associação das medidas qualitativas foi aplicado o teste de Pearson. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado para a comparação das medianas. A análise de correlação foi feita através do coeficiente de Spearman.

#### **4.11. Considerações éticas**

Para realização do estudo, foram utilizadas amostras de sangue e medidas de carótida dos pacientes incluídos no Ensaio Clínico Duplo Cego Randomizado: Efeito da Atorvastatina/AAS *versus* Placebo em Pacientes com HIV em uso de Antirretrovirais e com Baixo Risco Cardiovascular na função endotelial e na inflamação, submetido ao CNPq através do Edital Universal MCTI/CNPq N ° 14/2012, com aprovação pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Pernambuco em 17 de junho de 2013 (CAAE 13097213.20000.5208). Os participantes do ensaio clínico foram incluídos no estudo após o esclarecimento completo e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. As informações foram guardadas com sigilo, a fim de manter a confidencialidade, e os dados que pudessem identificar os indivíduos foram guardadas pela equipe de pesquisadores, com acesso restrito entre os envolvidos no estudo.

***RESULTADOS***

## **5.1.MEDIADORES INFLAMATÓRIOS E ASSOCIAÇÃO COM O ESPESSAMENTO CAROTÍDEO ENTRE PESSOAS VIVENDO COM HIV, EM USO DE ANTIRRETROVIRAIS E COM BAIXO RISCO CARDIOVASCULAR**

### **INTRODUÇÃO**

Atualmente, os esforços para o controle da epidemia de HIV estão concentrados no diagnóstico precoce da infecção e no tratamento das pessoas vivendo com HIV/Aids (PVHA), bem como na implementação de intervenções de prevenção combinada. A estratégia de tratamento de PVHA como medida de prevenção requer não somente o diagnóstico oportuno da infecção, como também o investimento na melhoria do cuidado contínuo desses indivíduos<sup>1,2</sup>.

O aumento da longevidade em PVHA devido a terapia antirretroviral (TARV) eficaz e disponível trouxe doenças crônicas não transmissíveis, como doenças cardiovasculares (DCV)<sup>3</sup>. De acordo com estudos realizados, o vírus e a TARV são fatores que favorecem aumento dos mediadores inflamatórios e espessamento carotídeo<sup>4,5</sup>. Infectados pelo HIV têm níveis elevado de proteína C-reativa (PCR), que está associada à aterosclerose e maior risco de infarto do miocárdio. Níveis de IL-6, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interferon gama (IFN- $\gamma$ ), IL-1, molécula de adesão intracelular (sICAM) e molécula de adesão celular vascular (sVCAM), que ajudam na progressão da DCV, também estão aumentados nessa população<sup>6,7,8</sup>.

Porém, estudos não avaliaram esses fatores na população considerada baixo risco cardiovascular, que apresenta baixa pré-disposição a distúrbios cardiovasculares, não sendo observado, dessa forma, o que seria realmente o possível efeito da inflamação causada pelo vírus e efeito tóxico do medicamento. Além disso, não foi estudada uma população em que todos os pacientes apresentassem carga viral indetectável e usassem apenas os esquemas Inibidor da Transcriptase Reversa Análogo de Nucleosídeo (ITRN) e Inibidor da Transcriptase Reversa Não Análogo de Nucleosídeo (ITRNN). Já que se é sabido que os medicamentos Inibidores de protease (IPs) possuem efeito elevado sobre distúrbios cardiovasculares.

Deste modo, o presente estudo avaliou os mediadores inflamatórios IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , PCR-us, sVCAM-1 e 1sICAM-1 e associou ao espessamento carotídeo em pessoas vivendo com HIV, em uso de antirretrovirais ITRN e IRNN e com baixo risco cardiovascular, sendo o baixo risco determinado pelo escore de risco de Framingham (ERF).

Além de comparar espessura mediointimal de carótida e níveis de mediadores inflamatórios, entre pessoas com e sem o vírus HIV.

## **METODOLOGIA**

### **Desenho do Estudo**

Estudo Transversal, analítico, foi realizado no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco/ Recife-PE, Brasil. Foi descrita a associação entre mediadores inflamatórios e espessamento carotídeo na população de pacientes vivendo com HIV em uso de antirretrovirais e com baixo risco cardiovascular. Além de avaliar se existe diferença nos níveis dos biomarcadores inflamatórios e medidas da espessura mediointimal da carótida entre pessoas vivendo com e sem o HIV.

### **População e Local do Estudo**

Foi utilizada uma amostra de conveniência de 115 pacientes, sendo 99 indivíduos com HIV e 16 sem o HIV, com idades entre  $\geq 18$  e  $\leq 60$  anos, de ambos os sexos. Além do diagnóstico de infecção pelo HIV, os pacientes com o vírus deveriam estar em uso de esquema com 2 ITRN + 1 ITRNN, iniciado em qualquer momento a partir do seu diagnóstico e carga viral indetectável. O baixo risco para doença cardiovascular também foi um critério de inclusão para ambos os grupos, sendo calculado pelo Escore de Risco de Framingham. O ERF estima a probabilidade de ocorrer infarto do miocárdio ou morte por doença coronária no período de 10 anos em indivíduos sem diagnóstico prévio de aterosclerose clínica. Utiliza para o cálculo de risco parâmetros como sexo, idade, níveis de colesterol total e colesterol HDL, pressão arterial sistólica e tabagismo<sup>9</sup>.

Os pacientes com HIV faziam parte do Serviço de Atendimento Especializado em HIV/Aids do hospital, e os indivíduos sem o HIV eram acompanhantes de pacientes atendidos no serviço de Urologia do hospital. Para a inclusão dos grupos foi realizado questionários semelhantes, sendo retiradas do questionário para o grupo sem o HIV, apenas as perguntas relacionadas ao vírus.

### **Coleta de Dados**

Após o paciente assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foram coletados dados através de questionário padronizado, informações de prontuários dos pacientes e formulário de exames, onde eram anotados resultados das medidas da espessura

mediointimal de carótida, lipidograma e níveis dos biomarcadores inflamatórios. No momento da inclusão do paciente, era realizada coleta de sangue para lipidograma e dosagem dos biomarcadores inflamatórios, medida da pressão arterial, e exame de ultrassom Doppler de carótidas.

### **Dosagem dos Mediadores Inflamatórios**

As dosagens dos mediadores inflamatórios (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, sVCAM-1 e sICAM-1) foram realizadas pelo método Cytometric Bead Array (CBA), os soros e os padrões de marcadores do kit foram incubados com microesferas de captura recobertas com anticorpos específicos para os marcadores e com o anticorpo de detecção marcado com ficoeritrina (PE), que fornece um sinal fluorescente na proporção da quantidade do analito ligado. Após as incubações foi acrescentado 1 ml da solução de lavagem e centrifugado por 10 minutos a 1100 rpm. O sobrenadante foi desprezado e com 300  $\mu$ l da solução de lavagem, as amostras foram ressuspensas para as dosagens em citômetro de fluxo, sendo os resultados gerados em formato de gráfico e tabular utilizando o BD CBA Software FCAP Array, versão 3.01. A PCR-us foi dosada pela técnica de Imunoturbidimetria em látex, em que a proteína C reativa reage com o anticorpo específico formando imunocomplexos insolúveis.

### **Medições da espessura mediointimal de carótida**

As medidas de EMI foram realizadas usando aparelho de ultrassom marca GE, modelo LOGIQe BT12. O aparelho dispõe do software DICOM 3.0 e Auto IMT, com imagem automática, bem monitorada. Os exames foram realizados por duas examinadoras, sendo duas médicas cirurgiãs vasculares qualificadas com título de Especialista em Ecografia Vascular, emitido pela Sociedade Brasileira de Angiologia e Cirurgia Vascular (SBACV). Foi realizada a medida na parede posterior do vaso estudado, em área livre de placa, e foi definida como sendo a distância entre duas linhas ecogênicas representadas pela interface lúmen-íntima e média-adventícia da parede arterial. A média da medida automática da carótida comum mais espessada foi definida como referência, seja ela direita (CCD) ou esquerda (CCE). A. Considerou-se a presença de placa quando demonstrado um espessamento do EMI  $> 1,5\text{mm}$ <sup>10, 11, 12</sup>.

### **Análise estatística**

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software STATA, versão 11.0. Em todos os testes, o nível de significância adotado foi  $p \leq 0,05$ . As variáveis qualitativas

foram expressas através das frequências absolutas e relativas, e quantitativas através das estatísticas descritivas, tais como: média, desvio padrão, mediana, percentil 25 e 75, sendo aplicado o teste t de student. Para os testes de associação das medidas qualitativas foi aplicado o teste de Pearson. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado para a comparação das medianas. A análise de correlação foi feita através do coeficiente de Spearman.

### **Considerações éticas**

A Pesquisa foi aprovada pelo comitê de ética da Universidade Federal de Pernambuco.

## **RESULTADOS**

Participaram do estudo 99 pacientes portadores do HIV e 16 não portadores do HIV. Dos portadores de HIV, (59,6%) tinham 40 anos ou mais. Para os não portadores do vírus (75,0%) tinham 40 anos ou mais. Comparando as características dos grupos, houve diferença quando comparados os marcadores inflamatórios IFN- $\gamma$ , IL-1 e TNF- $\alpha$ . Observa-se um maior nível desses marcadores no grupo controle. Em relação às médias de EMI, não foi apresentado diferença significativa entre os grupos (Tabela 1).

A distribuição quanto ao sexo, tabagismo e diabetes foram semelhantes entre os grupos de comparação. Quanto às medidas laboratoriais, duas variáveis tiveram significâncias limitrofes na comparação dos HIV e não HIV: os níveis médios de HDL foram maiores entre os pacientes com HIV, enquanto a média de LDL foi menor nesse grupo. Quanto ao tempo de TARV no grupo dos portadores de HIV, 37% deles tem tempo inferior a 5 anos de tratamento antirretroviral, enquanto que 29,3% tinham entre 5 e 10 anos de terapia e 33,7% mais de 10 anos de terapia. Quanto aos níveis de CD4 e carga viral na admissão para o estudo, 90,5% tinham níveis de CD4 acima de 350 células e todos tinham carga viral indetectável, este último parâmetro foi obrigatório na inclusão. Da classe dos antirretrovirais ITRN usada pelos pacientes, 98 (98,98%) usavam lamivudina, 65 (65,65%) zidovudina, 32 (32,32%) tenofovir, e 3 (3,03 %) didanosina. Da classe dos antirretrovirais ITRNN, 93 (93,93%) usavam efavirenz e 6 (6,06%) nevirapina (Tabela 1).

Quando calculado o percentil 75 para os 115 pacientes estudados, o valor foi de 0,61 mm, portanto EMI foi considerada espessada se  $> 0,61$  mm. A presença de EMI  $\geq P75$  no grupo HIV foi de 51,51 %, desses, 78,4% tinham 40 anos ou mais, para o grupo não HIV, a presença de EMI  $\geq P75$  foi de 56,25, sendo 88,9 % desses pacientes  $\geq 40$  anos, mostrando que

maior idade está associada ao aumento da espessura da carótida. A condição de tabagismo se mostrou com uma associação limítrofe ( $p = 0,082$ ) indicando uma possível maior medida da espessura entre os fumantes. Níveis mais elevados de colesterol total e LDL se mostraram associados à  $EMI \geq P75$ , no grupo sem o HIV (Tabela 2).

Na análise multivariada nos pacientes HIV, após a análise ser ajustada por idade, tabagismo e colesterol houve associação significativa com os níveis do TNF- $\alpha$ , onde o aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  foi associado a uma maior chance de aterosclerose, assim como o aumento dos níveis de IL-1- $\beta$  apresentou uma maior chance de aterosclerose com um p-valor próxima a significância (Tabela 3).

## DISCUSSÃO

Esse é o primeiro estudo que conhecemos na população de HIV positivos, em que se avaliou biomarcadores da inflamação associando a presença de espessamento médio intimal de carótida apenas nos indivíduos considerados baixo risco cardiovascular pelo escore de risco de Framingham, que usassem exclusivamente as classes de antirretrovirais ITRN e ITRNN e com carga viral indetectável. Essa população apresenta baixa pré-disposição a distúrbios cardiovasculares, podendo ser observado com maior clareza possível efeito da inflamação provocada pelo HIV ou distúrbios provocados pelo uso dessas classes de antirretrovirais.

Na avaliação dos níveis dos biomarcadores inflamatórios foi encontrado maior nível de IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  no grupo sem o HIV quando comparado ao grupo HIV, para os marcadores IL-6, PCR-us, sVCAM-1 e sICAM-1 não foi observado diferença quanto ao nível desses biomarcadores entre os grupos de comparação. Esses dados contrapõem-se aos de Ross et al<sup>4</sup>, em que níveis dos marcadores inflamatórios TNF- $\alpha$ , PCR-us, IL-6 e sVCAM-1 foram significativamente mais elevados no grupo infectado com HIV do que o grupo de pessoas sem o vírus. Bethan et al<sup>13</sup>, também observou níveis mais elevados de IL-6 e PCR-us em HIV positivos quando comparados com os controles. Nosso estudo excluiu pacientes com carga viral detectável, que é um fator contribuinte para o aumento desses marcadores no organismo, já os estudos citados não usaram a carga viral detectável como critério de exclusão, e esse pode ter sido um fator influente na discordância dos resultados. Estudo retrospectivo de amostras obtidas de doadores de plasma antes, durante e após a aquisição do HIV demonstrou elevações em várias citocinas durante a expansão viral<sup>14</sup>. Outro estudo relata que a iniciação da TARV na infecção crônica está associada a um declínio nos níveis

circulantes de citocinas, incluindo IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , possivelmente por redução da carga viral<sup>15</sup>. Além disso, observamos que os pacientes estão, na sua maioria, sob tratamento antirretroviral há > de 5 anos, e portanto com controle virológico há muito tempo, possivelmente revertendo as repercussões do vírus no espessamento carotídeo e nos marcadores inflamatórios. Outra hipótese para o nosso resultado pode ter sido a maior idade no grupo sem o HIV, já que a idade é um fator que contribuiu para aumento de níveis de marcadores inflamatórios e aterosclerose.

Quanto às medidas laboratoriais, níveis médios de HDL foram maiores e menor a média de LDL no grupo HIV em comparação ao grupo sem HIV. As médias de triglicérido e colesterol total não apresentaram diferença significativa entre os grupos HIV e não HIV. Porém níveis mais elevados de colesterol total e LDL se mostraram associados à EMI  $\geq$  P75, no grupo sem o HIV. Estudos anteriores divergem em relação às medidas de lipidograma. No estudo de Ross et al<sup>4</sup>, o grupo infectado pelo HIV apresentou menor média de HDL, mas colesterol total, triglicéridos e LDL foram semelhantes entre os grupos. Os níveis de colesterol LDL e triglicérido foi correlacionado positivamente com EMI. Já em Nguemaim et al<sup>16</sup>, soropositivos tiveram valores de triglicérido significativamente mais elevados e valores mais baixos de colesterol total, HDL e LDL em comparação com o grupo não HIV. Essa divergência de resultados entre os estudos ainda não está clara, porém estudo realizado na Nigéria mostrou que os níveis de triglicérido estavam inversamente correlacionados com contagens de CD4 e positivamente correlacionados com a carga viral<sup>17</sup>. Nosso resultado pode ser justificado pela maior média de idade nos pacientes sem o HIV, dado que foi significativa. Sabidamente níveis de HDL reduzem com a idade, enquanto níveis de LDL e colesterol total se elevam. O sexo masculino mais freqüente entre os não HIV, apesar de não fazer parte da análise, também pode ter contribuído para esta diferença. Por fim, pacientes sob constantes consultas, vigilância médica e orientações para modificação do estilo de vida podem ter contribuído para este achado.

Corroborando com a literatura, esse estudo reforça que a idade  $\geq$  40 anos, tabagismo e diabetes são fatores associados à alteração da medida da espessura mediointimal de carótida, portanto aumentam o risco de desenvolvimento de doença cardiovascular.

As médias das medidas de EMI mostraram não haver diferença estatisticamente significativa quando comparado a média dos pacientes com e sem HIV. Lorenz et al<sup>18</sup>, em estudo anterior havia demonstrado maior média de EMI no grupo HIV quando comparado a média do controle sem o vírus. Porém a população do nosso estudo é considerada baixo risco cardiovascular pelo cálculo do score de risco de Framingham e isso pode justificar o nosso resultado. No estudo de Falcão et al<sup>19</sup>, pacientes classificados com médio ou alto risco

cardiovascular pelo escore de Framingham tiveram 3,7 vezes mais chance de apresentar aterosclerose do que os pacientes considerados baixo risco. Em outro estudo, os pacientes com aterosclerose subclínica apresentaram maior pontuação de risco comparado com aqueles com espessura mediointimal normal. Para cada 10% de aumento no escore de risco de Framingham, as probabilidades de ter uma EMI anormal triplicaram<sup>20</sup>.

Quando avaliado a associação entre marcadores inflamatórios e EMI, a partir do cálculo de P75, na análise multivariada nos pacientes HIV, houve associação significativa com os níveis de TNF- $\alpha$ , onde o aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  foi associado a uma maior chance de aterosclerose, assim como o aumento dos níveis de IL1- $\beta$  apresentou uma maior chance de aterosclerose com um p-valor próxima a significância. Esses dados discordam de Falcão et al<sup>19</sup> que não encontrou associação entre marcadores inflamatórios (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , PCR-us, sVCAM-1 e 1sICAM-1) e espessamento médio intimal de carótida. Estudo de Ssinabulya et al<sup>20</sup>, encontrou resultado semelhante, em que níveis elevados de PCR-us não foi associado com EMI. Porém em outros dois estudos realizados, maior EMI foi associada com níveis mais elevados de IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$ , PCR-us e sVCAM-1.<sup>4,5</sup> Tanto nosso estudo, quanto os demais citados apresentam tamanho de amostra pequena, sendo necessário estudos com maior tamanho de amostra, que possam confirmar com maior acurácia a relação entre marcadores inflamatórios e a ocorrência de aterosclerose carotídea.

Nosso resultado pode ser explicado pela seleção criteriosa dos nossos pacientes. Ambos são atendidos em um centro de referência no tratamento do HIV, tendo um bom acompanhamento médico. Nossa amostra avalia um paciente "ideal", ou seja, que está com carga viral indetectável, provavelmente há muito tempo, já que o tempo de TARV é  $\geq 5$  anos em 63% dos pacientes e sem uso prévio ou atual de Inibidores de Protease. Além disso, o cálculo pelo escore de risco de Framingham para doença cardiovascular é baixo.

Esses dados alertam para a importância de um trabalho de conscientização dos pacientes por parte dos profissionais de saúde, orientando os e controlando fatores de risco como tabagismo, diabetes, hipertensão e dislipidemia. Isso implica que os centros de tratamento do HIV precisam oferecer recursos que possam identificar pacientes em risco para intervenção precoce. Exames laboratoriais, para testar níveis de marcadores que predizem risco cardiovascular, assim como exame de imagem são necessários na população HIV positivos, principalmente em pacientes com idade  $\geq 40$  anos e com mais de dez anos de uso da TARV.

Portanto nosso estudo traz resultados promissores e demonstra que o controle da carga viral com ITRN e ITRNN somado à manutenção de parâmetros de risco cardiovascular sob controle, tais como tabagismo, diabetes, hipertensão e dislipidemia, resultam ao paciente com

HIV bom prognóstico cardiovascular e menor risco de ocorrência de aterosclerose subclínica, sendo comparado ao risco da população geral.

Tivemos como limitação, tamanho de amostra estreito para o grupo não HIV e maior média de idade nessa população, porém nossos resultados trazem dados importantes para literatura, que podem servir como suporte para pesquisas futuras.

**Tabela 1. Comparação entre os grupos de pacientes HIV e não HIV quanto a características biológicas, fatores de risco para doença cardiovascular, mediadores inflamatórios, medidas de EMI e fatores relacionados ao HIV.**

Características	Grupos		p-valor
	HIV (n = 99)	Não HIV (n = 16)	
<b>Idade<sup>a</sup></b>	42,2 ± 8,9	48,7 ± 9,1	<b>0,007</b>
<b>Faixa etária</b>			
< 40 anos	40 (40,4%)	4 (25,0%)	0,239
40 anos ou mais	59 (59,6%)	12 (75,0%)	
<b>Sexo</b>			
Feminino	39 (39,4%)	4 (25,0%)	0,404
Masculino	60 (60,6%)	12 (75,0%)	
<b>Tabagismo</b>			
Sim	12 (12,1%)	0 (-)	0,213
Não	87 (87,9%)	16 (100%)	
<b>Diabetes</b>			
Sim	3 (3,0%)	0 (-)	1,000
Não	96 (97,0%)	16 (100%)	
<b>Medidas laboratoriais</b>			
Colesterol total <sup>a</sup>	184,0 ± 35,4	190,37 ± 48,9	0,528
HDL <sup>a</sup>	50,3 ± 14,2	43,6 ± 7,8	<b>0,069</b>
LDL <sup>a</sup>	105,3 ± 27,2	118,5 ± 38,2	<b>0,093</b>
Triglicerídeos <sup>b</sup>	116,2 (79,6; 176)	120,1 (90,1; 191,3)	0,695
<b>Medida de espessamentomedointimal de carotida</b>			
EMI média <sup>a</sup>	0,573 ± 0,123	0,586 ± 0,116	0,697
<b>Mediadores inflamatórios<sup>b</sup></b>			
PCR US	0,1 (0; 0,4)	0,1 (0; 0,3)	0,680
ICAM-1	0 (0; 0)	0 (0; 0)	1,000
VCAM-1(x10 <sup>-3</sup> )	12,12 (11,42; 12,62)	12,94 (10,59; 13,47)	<b>0,071</b>
IFN	2,16 (1,98; 2,40)	2,67 (2,29; 2,91)	<b>0,002</b>
IL-1	2,87 (2,87; 2,87)	2,87 (2,87; 4,08)	<b>0,027</b>
IL-6	2,1 (2,1; 2,1)	2,1 (2,1; 2,1)	0,689
TNF-α	2,26 (2,26; 2,26)	2,26 (2,26; 7,55)	<b>0,005</b>
<b>Tempo de TARV</b>			
Menos de 5 anos	34 (37,0%)	-	-
De 5 a menos de 10 anos	27 (29,3%)	-	
10 anos ou mais	31 (33,7%)	-	
<b>Classificação do CD4</b>			
Menos de 200	2 (2,1%)	-	-
De 200 a 349	7 (7,4%)	-	
350 ou mais	86 (90,5%)	-	
<b>Uso de Antirretrovirais</b>			
Lamivudina	98 (98,98%)		
zidovudina	65 (65,65%)		
Tenofovir	32 (32,32%)		
Didanosina	3 (3,03 %)		
Efavirenz	93 (93,93%)		
Nevirapina	6 (6,06%)		

<sup>a</sup> Média ± dp - aplicado o teste t de student

<sup>b</sup> Mediana (P<sub>25</sub>; P<sub>75</sub>)- aplicado o teste de Kruskal-Wallis

**Tabela 2. Associação dos fatores relacionados à espessura mediointimal carotídea estratificados segundo a condição de infecção pelo HIV**

Fatores	Pacientes HIV			Pacientes Não HIV		
	< P <sub>75</sub>	≥ P <sub>75</sub>	p-valor	< P <sub>75</sub>	≥ P <sub>75</sub>	p-valor
<b>Idade<sup>a</sup></b>	37,9 ± 7,1	46,3 ± 8,5	<b>&lt;0,001</b>	44,0 ± 9,8	52,4 ± 7,0	<b>0,063</b>
<b>Faixa etária</b>						
< 40 anos	29 (60,4%)	11 (21,6%)	<b>&lt;0,001</b>	3 (42,9%)	1 (11,1%)	0,192
40 anos ou mais	19 (39,6%)	40 (78,4%)		4 (57,1%)	8 (88,9%)	
<b>Sexo</b>						
Feminino	19 (39,6%)	20 (39,2%)	0,970	2 (28,6%)	2 (22,2%)	0,608
Masculino	29 (60,4%)	31 (60,8%)		5 (71,4%)	7 (77,8%)	
<b>Tabagismo</b>						
Sim	3 (6,3%)	9 (17,7%)	<b>0,082</b>	0 (-)	0 (-)	-
Não	45 (93,7%)	42 (82,3%)		7 (100%)	9 (100%)	
<b>Diabetes</b>						
Sim	1 (2,1%)	2 (3,9%)	0,594	0 (-)	0 (-)	-
Não	47 (97,9%)	49 (96,1%)		7 (100%)	9 (100%)	
<b>Medidas laboratoriais</b>						
Colesterol total <sup>a</sup>	178,1 ± 33,8	199,9 ± 58,3	0,395	175,7 ± 31,5	191,8 ± 37,4	0,023
HDL <sup>a</sup>	41,5 ± 9,8	45,2 ± 5,9	0,362	50,4 ± 17,6	50,1 ± 10,3	0,931
LDL <sup>a</sup>	110,9 ± 23,3	124,4 ± 47,4	0,504	98,5 ± 21,7	111,4 ± 30,2	0,020
Triglicerídeos <sup>b</sup>	113 (72; 181)	118 (86; 174)	0,459	117 (86; 169)	122 (101; 200)	0,560
<b>Mediadores inflamatórios<sup>b</sup></b>						
PCR US	0,1 (0; 0,4)	0,1 (0; 0,4)	0,966	0,1 (0; 0,6)	0,1 (0; 0,1)	0,581
ICAM-1 <sup>c</sup>	-	-	-	-	-	-
VCAM-1(x10 <sup>-3</sup> )	12,1 (11,3; 12,6)	12,0 (11,4; 12,6)	0,931	13,0 (6,6; 13,6)	12,9 (10,8; 13,4)	1,000
IFN	2,16 (1,98; 2,37)	2,21 (1,93; 2,43)	0,481	2,91 (1,96; 3,24)	2,66 (2,32; 2,72)	0,368
IL-1	2,87 (2,87; 2,87)	2,87 (2,87; 2,87)	1,000	2,87 (2,87; 4,40)	2,87 (2,87; 3,77)	0,597
IL-6 <sup>c</sup>	-	-	-	-	-	0,149
TNF-α	2,26 (2,26; 2,26)	2,26 (2,26; 2,26)	0,328	2,26 (2,26; 6,75)	2,26 (2,26; 13,7)	0,634
<b>Tempo de TARV</b>						
Menos de 5 anos	19 (43,2%)	15 (31,2%)	0,383	-	-	-
De 5 a menos de 10	13 (29,5%)	14 (29,2%)		-	-	-
10 anos ou mais	12 (27,3%)	19 (39,6%)		-	-	-

P<sub>75</sub> do EMI = 0,61

<sup>a</sup>Média ± desvio padrão - teste t de student

<sup>b</sup>Mediana (P<sub>25</sub>; P<sub>75</sub>) - Teste de Mann-Whitney

<sup>c</sup>Não há variação (todos os valores iguais ao mínimo)

**Tabela 3. Associação dos fatores relacionados à espessura mediointimal carotídea, emanálise multivariada, estratificados segundo a condição de infecção pelo HIV.**

Mediadores Inflamatórios <sup>c</sup>	Pacientes HIV		Pacientes Não HIV	
	EMI > P <sub>75</sub> OR (IC 95%) <sup>a</sup>	p-valor	EMI > P <sub>75</sub> OR (IC 95%) <sup>b</sup>	p-valor
PCR US	1,17 (0,45 – 2,98)	0,747	0,31 (0,02 – 5,31)	0,425
VCAM-1(x10 <sup>-3</sup> )	0,54 (0,21 -1,38)	0,197	1,08 (0,07 – 17,4)	0,954
IFN	1,76 (0,69 – 4,51)	0,238	Não calculado	0,175
IL-1	10,4 (0,71 – 151,2)	<b>0,087</b>	6,14 (0,24 – 156)	0,272
TNF-α	31,2 (2,70 – 361)	<b>0,006</b>	3,06 (0,12 – 79,3)	0,500

<sup>a</sup>Ajustados por idade e tabagismo

<sup>b</sup>Ajustados por idade e colesterol total

<sup>c</sup>Análise considerando o valor mediano dos marcadores

1. MONTANER, J.S. **Treatment as prevention: toward an AIDS-free generation.** *Top Antivir Med.* 21(3):110-4, Jul-Aug, 2013.
2. UNAIDS, **global statistics, 2016**
3. WORLD HEALTH ORGANIZATION, **Global Health Observatory Data: Antiretroviral therapy (ART) coverage among all age groups, 2015**
4. ROSS A.C. et al. **Relationship between Inflammatory Markers, Endothelial Activation Markers, and Carotid Intima-Media Thickness in HIV-Infected Patients Receiving Antiretroviral Therapy.** *Clinical Infectious Diseases.* 49:1119–27, 2009.
5. KAPLAN, R.C. et al. **Potential cardiovascular disease risk markers among HIV-infected women initiating antiretroviral treatment.** *J. Acquir Immune Defic Syndr.* August 1, 60(4): 359–368, 2012.
6. HSUE, P.Y. et al. **Carotid Intima-Media Thickness Progression in HIV-Infected Adults Occurs Preferentially at the Carotid Bifurcation and Is Predicted by Inflammation.** *J Am Heart Assoc.* 2012.
7. LIBBY P. **Inflammation and cardiovascular disease mechanisms.** *Am J Clin Nutr.* 83(2):456S–460S, 2006.
8. TRIANT, V.A.; MEIGS, J.B.; GRINSPOON, S.K. **Association of C-reactive protein and HIV infection with acute myocardial infarction.** *J Acquir Immune Defic Syndr.* 51:268–73, 2009.
9. SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. **IV Diretriz Brasileira sobre dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia.** *Arq Bras Cardiol.* 88, Supl I, 2007.
10. GODOI, E.T. et al. **Antiretroviral therapy effect in the intima-media complex and ankle-brachial index in patients infected by HIV.** *J Vasc Bras.* 11(2):123-31, 2012.

11. GODOI, E.T. et al. **Assessment of intima-media complex in carotid, femoral and right subclavian arteries for early investigation of atherosclerosis in HIV-infected patients.** *Radiol Bras.* 46(6):333-40, 2013.
12. FREIRE, C.M. et al. **Recomendação para a quantificação pelo ultrassom da doença aterosclerótica das artérias carótidas e vertebrais: grupo de trabalho do departamento de imagem cardiovascular da Sociedade Brasileira de Cardiologia – DIC – SBC.** *Arq Bras Cardiol.* 28(nº especial):e1-e64, 2015.
13. BETHAN MCDONALD. et al. **Persistently Elevated Serum Interleukin-6 Predicts Mortality Among Adults Receiving Combination Antiretroviral Therapy in Botswana: Results from a Clinical Trial.** *AIDS Res Hum Retroviruses.* Jul; 29(7): 993–999, 2013.
14. STACEY, A.R. et al. **Induction of a striking systemic cytokine cascade prior to peak viremia in acute human immunodeficiency virus type 1 infection, in contrast to more modest and delayed responses in acute hepatitis B and C virus infections.** *J. Virol.* 83:3719–3733, 2009.
15. HAISSMAN, J.M. et al. **Plasma cytokine levels in Tanzanian HIV-1-infected adults and the effect of antiretroviral treatment.** *J Acquir Immune Defic Syndr.* 52:493–497, 2009.
16. NGUEMAÏM, N.F. et al. **Serum lipid profile in highly active antiretroviral therapy-naive HIV-infected patients in Cameroon: a case-control study.** *HIV Med.* 11:353–9, 2010.
17. KUTI, M.A. et al. **Dyslipidemia in ART-Naive HIV-Infected Persons in Nigeria- Implications for Care.** *J Int Assoc Provid AIDS Care.* 14:355–9. doi: 10.1177/2325957414555227, 2015.
18. LORENZ, M.W. et al. **Both long-term HIV infection and highly active antiretroviral therapy are independent risk factors for early carotid atherosclerosis.** *Atherosclerosis .* 196:720–6, 2008.

**19. FALCÃO, M.D.A. et al. Association of biomarkers with atherosclerosis and risk for coronary artery disease in patients with HIV. Arq Bras Cardiol. Nov;99(5):971-8. Epub Oct 18, 2012.**

**20. SSINABULYA. I. et al. Subclinical Atherosclerosis among HIV-Infected Adults Attending HIV/AIDS Care at Two Large Ambulatory HIV Clinics in Uganda. Published online Feb 28. doi: 10.1371/journal.pone.0089537, 2014.**

***CONCLUSÕES***

## 6. CONCLUSÕES

1. Indivíduos HIV positivos, apresentando carga viral indetectável, considerados baixo risco para o desenvolvimento de doença cardiovascular e que usam as medicações ITRN e IRNN, apresentaram risco semelhante às pessoas sem o vírus de desenvolver aterosclerose subclínica.
2. Os marcadores inflamatórios IL-6, PCR-us, sVCAM-1 e sICAM-1 apresentaram níveis semelhantes no grupos estudados e IFN- $\gamma$ , IL-1 e TNF- $\alpha$  tiveram níveis mais baixo na população HIV.
3. Quando avaliada a associação entre marcadores inflamatórios e EMI, a partir do cálculo de P75, na análise multivariada nos pacientes HIV, os marcadores TNF- $\alpha$  e IL1- $\beta$  se mostraram associados a uma maior chance de aterosclerose.
4. A idade, tabagismo e maior nível de colesterol total e LDL foram fatores que contribuíram para o espessamento de carótida.

**REFERENCIAS**

ABERG, J.A. et al. **Cardiovascular complications in HIV management: past, present, and future.** *J Acquir Immune Defic Syndr.* 50(1):54–64, 2009.

ADEWOLE, O.O.; EZE, S.; YE, B. **Lipid profile in HIV/AIDS patients in Nigeria.** *Afr Health Sci.*10(2):144–149, 2010.

AITOUFELLA, H.; TALEB, S.; MALLAT, Z.; AND TEDGUI, A. **Recent advances on the role of cytokines in athero sclerosis,** *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 31, 969979, 2011.

ARILDSEN, H. et al. **Endothelial dysfunction, increased inflammation, and activated coagulation in HIV-infected patients improve after initiation of highly active antiretroviral therapy-HIV.** *HIV Medicine.* 14,1-9,2012.

BARBARO, G.; IACOBELLIS, G. **Metabolic syndrome associated with HIV and highly active antiretroviral therapy.** *Curr Diab Rep.*9(1):37–42, 2009.

BRASIL, **Ministério da Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS.** Boletim epidemiológico HIV/ AIDS. Brasília-DF, Ano II no 1, 2013.

BRASIL, **Ministério da Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS.** Ano III. Boletim epidemiológico HIV/AIDS. Brasília-DF, Ano III, 2014.

BRASIL, **Ministério da Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS.** Boletim epidemiológico HIV/ AIDS. Brasília-DF, Ano III, nº 1, 2006.

BELTRÁN, L.M.; GARCÍA-PUIG, J. **Influence of immune activation and inflammatory response on cardiovascular risk associated with the human immunodeficiency virus.** *Vasc Health Risk Management.* 11: 35–48, 2015.

BLOOMFIELD, M.D.; GERALD, S.; CLAUDIA LEUNG, B.S. **Cardiac Disease Associated with Human Immunodeficiency Virus Infection.** *Cardiol Clin*\_Feb;35(1):59-70. doi: 10.1016/j.ccl.2016.09.003, 2017.

CALZA, L.D. et al. **Plasma levels of VCAM-1, ICAM-1, ESelectin, and P-Selectin in 99 HIV-positive patients versus 51 HIV-negative healthy controls.** *J. Acquir. Immune Defic. Syndromes.* 50430e432, 2009.

CANAULT, M. et al. **Progression of atherosclerosis in ApoEdeficient mice that express distinct molecular forms of TNF alpha.** *J. Pathol.* 214, 574583, 2008.

CARR, A.; COOPER, D.A. **Adverse effects of antiretroviral therapy.** *The Lancet HIV.* 356:1423-30, 2000.

CAREY, D. et al. **Lipid profiles in HIV-infected adults receiving atazanavir and atazanavir/ritonavir: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials.** *J Antimicrob Chemother.* 65(9):1878–88, 2010.

CLARKE, M. C.; TALIB, S.; FIGG, N. L.; BENNETT, M. R. **Vascular smooth muscle cell apoptosis induces interleukin1directed inflammation: effects of hyperlipidemia mediated inhibition of phagocytosis.** *Circ. Res.* 106, 363372. 83, 2010.

CHOW. F.C. et al. **Comparison of ischemic stroke incidence in HIV-infected and non-HIV-infected patients in a US health care system.** *J Acquir Immune Defic Syndr.* 60:351–8, 2012.

COHENM, S.; CHEN, Y.Q.; MCCAULEY, M. **Prevention of HIV-1 infection with early antiretroviral therapy.** *N Engl J Med.* 11;365(6):493-505, 2011.

CONKLIN, B. et al. **HIV protease inhibitor ritonavir induces endothelial dysfunction in porcine arteries.** *J. Surg Res.* 114:249, 2003.

CURRIER, J.S.; LUNDGREN, J.D.; CARR, A. **Epidemiological evidence for cardiovascular disease in HIV-infected patients and relationship to highly active antiretroviral therapy.** *Circulation, American Heart Association.* 118(2):e29–e35, 2008.

DAVIES, M.J. et al. **The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis.** *J Pathol.* 171(3):223-9, 1993.

DEKKER, D. et al. **The bilirubin-increasing drug atazanavir improves endothelial function in patients with type 2 diabetes mellitus.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 31(2):458–63, 2011.

DEVARAJ, S.; XU, D.Y.; JIALAL, I.C-**reactive protein increases plasminogen activator inhibitor-1 expression and activity in human aortic endothelial cells: implications for the metabolic syndrome and atherothrombosis.** *Circulation.* 107:398–404, 2003.

DOGGEN, C.J. et al. **C-reactive protein, cardiovascular risk factors and the association with myocardial infarction in men.** *J Intern Med.* 248:406–414, 2000.

EL-SADR, W.M. et al. **CD4+ count-guided interruption of antiretroviral treatment.** *N Engl J Med.* 355:2283–96, 2006.

EUGENIN, E.A.; MORGELLO. S.; KLOTMAN, M.E. **Human immunodeficiency virus (HIV) infects human arterial smooth muscle cells in vivo and in vitro: implications for the pathogenesis of HIV-mediated vascular disease.** *Am J Pathol.* 172(4):1100–1111, 2008.

FALCÃO J.C.Z, ARRUDAM.C.B, LACERDA, H.R, ALBUQUERQUE, V.M. **Associação dos Biomarcadores com Aterosclerose e Risco para Doença Coronariana em Portadores de HIV.** *Sociedade Brasileira de Cardiologia.* 99(5):971-978, 2012.

FATKHULLINA, A.R.; PESHKOVA, I.O.; KOLTSOVA, E.K.**The Role of Cytokines in the Development of Atherosclerosis.** *Biochemistry (Mosc).* Nov;81(11):1358-1370, 2016.

FISHER, S.D.; MILLER, T.L.; LIPSHULTZ, S.E. **Impact of HIV and highly active anti-retroviral therapy on leukocyte adhesion molecules, arterial inflammation, dyslipidemia, and atherosclerosis.***Atherosclerosis.* 185(1):1–11, 2006.

FREIBERG, M.S.et al. **HIV infection and the risk of acute myocardial infarction.** *JAMA Intern Med.* 173:614–22, 2013.

GALKINA, E. et al.**Lymphocyte recruitment into the aortic wall before and during development of atherosclerosis is partially Lselectin dependent.** *J. Exp. Med.* 203, 1273-1282, 2006.

GALVÃO J et al. **AIDS no Brasil: a agenda de construção de uma epidemia.** Rio de Janeiro: Ed.34, 2000.

GALLET B. et al. **Vascular complications associated with use of HIV protease inhibitors.** HIVLancet. 351(9120):1958–1959, 1998.

GAY, C.; DIBBEN, O.; JEFFREY, A. **Cross-sectional detection of acute HIV infection: timing of transmission, inflammation and antiretroviral therapy.** PloS one. Vol.6(5), pp.e19617, 2011.

GUIMARÃES, M.M.M.; GRECO, D.B.; FIGUEIREDO, S.M. **High-sensitivity C-reactive protein levels in HIV-infected patients treated or notwith antiretroviral drugs and their correlation with factors related to cardiovascular risk and HIV infection.** Atherosclerosis. 201: 434-9, 2008.

GUIMARÃES, M.M.M et al. **Doença cardiovascular aterosclerótica e a infecção pelo HIV: uma atualização.** Rev Med Minas Gerais. 23(4): 479-489, 2013.

HADIGAN, C.; MEIGS, J.B.; CORCORAN, C. **Metabolic abnormalities and cardiovascular disease risk factors in adults with human immunodeficiency virus infection and lipodystrophy.** Clin Infect Dis. 32(1):130–139, 2001.

HARVEY, E. J.; RAMJI, D. P. **Interferongamma and atherosclerosis: pro or antiatherogenic,** Cardiovasc.Res. 67, 1120. 25, 2005.

HANSSON, G.K. **Inflammation, Ctherosclerosis, and Coronary Artery Disease.** NEngl j Me. 352(16):1685-95, 2005.

HAN, X.; KITAMOTO, S.; LIAN, Q.; BOISVERT, W.A. **Interleukin-10 facilitates both cholesterol uptake and efflux in macrophages.** J Biol Chem.284(47):32950–32958, 2009.

HAN, X.; KITAMOTO, S.; WANG, H.; BOISVERT, W.A. **Interleukin-10 overexpression in macrophages suppresses atherosclerosis in hyperlipidemic mice.** FASEB J.24(8):2869–2880, 2010.

HEGELE, OH, J.; R.A. **HIV-associated dyslipidaemia: pathogenesis and treatment.** Lancet Infect Dis. 7:787-96, 2007.

HEMKENS, L.G.; BUCHER, H.C.; **HIV infection and cardiovascular disease.** Eur Heart J. 35(21):1373–1381, 2014.

HENRY, K.; MELROE, H.; HUEBSCH, J. **Severe premature coronary artery disease with protease inhibitors.** HIV Lancet. 351(9112):1328, 1998.

HSUE, P.Y. et al. **Role of viral replication, antiretroviral therapy; and immunodeficiency in HIV-associated atherosclerosis.** AIDS. 23: 1059-1067, 2009.

HUNT, P.W. et al. **Relationship between T cell activation and CD4+ T cell count in HIV-seropositive individuals with undetectable plasma HIV RNA levels in the absence of therapy.** J Infect Dis. 197:126–33, 2008.

ISLAM, F.M. et al. **Relative risk of cardiovascular disease among people living with HIV: a systematic review and meta-analysis.** HIV Med. 13(8):453–468, 2012.

KALICHMAN, A.; BUENO, S.M. **Vinte anos de assistência aos portadores de DST-HIV/AIDS no estado de São Paulo.** PraticaHosp. 6(33), 2004.

KAPLAN, R.C. et al. **Potential cardiovascular disease risk markers among HIVinfected women initiating antiretroviral treatment.** JAcquir Immune DeficSyndr. August 1, 60(4): 359–368, 2012.

KINGSLEY, L.A.; CUERVO-ROJAS, J. MUÑOZ, A. **Subclinical coronary atherosclerosis, HIV infection and antiretroviral therapy: Multicenter AIDS Cohort Study.** AIDS. 22(13):1589–1599, 2008.

KOIKE, T. et al. **Human C-reactive protein does not promote atherosclerosis in transgenic rabbits.** Circulation. 120:2088–2094, 2009.

KOLTSOVA, E.K. et al. **Dynamic T cellAPC interactions sustain chronic inflammation in ath erosclerosis.** J. Clin. Invest. 122, 31143126, 2012.

KURZ, K. et al. **Plasma concentrations of the cardiovascular risk factor asymmetric dimethylarginine (ADMA) are increased in patients with HIV-1 infection and correlate with immune activation markers.** *Pharmacol Res.* 60(6):508–514, 2009.

KULLER, L.H.; TRACY, R.; BELLOSO, W. **Inflammatory and coagulation biomarkers and mortality in patients with HIV infection.** *PLoS Med.* 5(10):e203, 2008.

LAKE, J.E. et al. **Regional fat deposition and cardiovascular risk in HIV infection: the FRAM study.** *AIDS Care.* 23(8):929-38, 2011

LAZZARETTI, R.K et al. **Dietary intervention prevents dyslipidemia associated with highly active antiretroviral therapy in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals: a randomized trial.** *J Am CollCardiol.* 59(11): 979–988, 2012

LEVI, G.C.; VITÓRIA, M.A. **Fighting against AIDS: the Brazilian experience.** *AIDS.* 16(18):2373-83, 2002.

LEFÈVRE, C.; AUCLAIR, M.; BOCCARA, F. **Premature senescence of vascular cells is induced by HIV protease inhibitors: implication of prelamin A and reversion by statin.** *ArteriosclerThrombVascBiol.* 30(12): 2611–2620, 2010.

LEINONEN, E.S.; HIUKKA, A.; HURT-CAMEJO, E. **Low-grade inflammation, endothelial activation and carotid intima-media thickness in type 2 diabetes.** *J Intern Med.* 256:119–27, 2004.

LIBBY, P. **Inflammation and cardiovascular disease mechanisms.** *Am J Clin Nutr.* 83(2):456S–460S, 2006.

LONGENECKER, C.T.; FUNDERBURG, N.T.; JIANG Y. **Markers of inflammation and CD8 T-cell activation, but not monocyte activation, are associated with subclinical carotid artery disease in HIV-infected individuals.** *HIV Med.* 14(6):385–390, 2013.

LORENZ, M.W.; STEPHAN, C.; HARMJANZ, A. **Both long-term HIV infection and highly active antiretroviral therapy are independent risk factors for early carotid atherosclerosis.** *Atherosclerosis.* 196(2):720–726, 2008.

MATUSIK, P. et al. **Do we know enough about the immune pathogenesis of acute coronary syndromes to improve clinical practice?**. *Thromb Haemost* 108: 443-456, 2012.

MCLAREN, J.E.; MICHAEL, D.R.,; ASHLIN, T.G RAMJI, D.P. **Cytokines, macrophage lipid metabolism and foam cells: implications for cardiovascular disease therapy**. *Prog Lipid Res.* 50(4):331–347, 2011.

MERCIÉ, P.; THIEBAUT, R.; LAVIGNOLLE, V. **Evaluation of cardiovascular risk factors in HIV-1 infected patients using carotid intima-media thickness measurement**. *Ann Med.* 34: 55-63, 2002.

MILLS, K. H. **Induction, function and regulation of IL17producing T cells**. *Eur. J. Immunol.* 38, 2636 2649, 2008.

MONTANER, J.S. **Treatment as prevention: toward an AIDS-free generation**. *Top Antivir Med.* Jul-Aug, 21(3):110-4, 2013.

MOUSSAVI, N. et al. **Lack of concordance between plasma markers of cardiovascular risk and intima-media thickness in patients with type 2 diabetes**. *Diabetes ObesMetab.* 6:69–77, 2004.

MU, H. et al. **Current update on HIV-associated vascular disease and endothelial dysfunction**. *World J Surg.*31(4):632–643, 2007.

NEUHAUS, J.; JACOBS, D.R.; BAKER, J.V. **Markers of inflammation, coagulation, and renal function are elevated in adults with HIV infection**. *J Infect Dis.* 201(12):1788–1795, 2010.

NORDELL, A.D.et al. **Severity of cardiovascular disease outcomes among patients with HIV is related to markers of inflammation and coagulation**. *J Am Heart Assoc.* 3(3):e000844, 2014.

OBEL, N. et al. **Ischemic heart disease in HIV-infected andHIV-uninfected individuals: a population based cohort study**. *Clin Infect Dis.* 44:1625-31, 2007.

OVBIAGELE, B.; NATH, A. **Increasing incidence of ischemic stroke in patients with HIV infection.** *Neurology*. 76(5):444–450, 2011.

PACKARD, R.R.S.; LIBBY, P. **Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction.** *Clin Chem* 54(1):24–38, 2008.

PIETROWSKI, E. **Proinflammatory effects of interleukin-17A on vascular smooth muscle cells involve NAD(P)H oxidase derived reactive oxygen species.** *Journal of vascular research*. 48: 52-58, 2011.

PINTO, A.C.S.; PINHEIRO, P.N.C.; VIEIRA, F.C.; ALVES M.D.S. **Compreensão da Pandemia da AIDS nos últimos 25 anos.** *DST – J bras Doenças Sex Transm*. 19(1): 45-50, 2007.

POLO RODRIGUEZ, R.. et al. **Grupo de expertos del Grupo de Estudio sobre Alteraciones Metabólicas (GEAM), de la Secretaría del Plan Nacional sobre el Sida (SPNS) y del Grupo de Estudio de Sida (GeSIDA). Consensus statement on metabolic disorders and cardiovascular risks in patients with human immunodeficiency virus.** *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 33: 40.e1- 40.e16, 2015

REN, Z.; YAO, Q.; CHEN. C. **HIV-1 envelope glycoprotein 120 increases intercellular adhesion molecule-1 expression by human endothelial cells.** *Lab Invest*. 82(3):245–255, 2002.

RIDKER, P.M.; GLYNN, R.J.; HENNEKENS, C.H. **C-reactive protein adds to the predictive value of total and HDL cholesterol in determining risk of first myocardial infarction.** *Circulation*. 97: 2007–2011, 1998.

RIDKER P.M, RIFAI N, PFEFFER M, SACKS F, LEPAGE S, BRAUNWALD E. **Elevation of tumor necrosis factor- $\alpha$  and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction.** *Circulation*. 101:2149–53, 2000.

RIDKER, P.M.; BURING, J.E.; RIFAI, N.; COOK, N.R. **Development and validation of improved algorithms for the assessment of global cardiovascular risk in women: the Reynolds Risk Score.** JAMA. 297(6):611-9, 2007.

RIMOLO, L.S.M.; CARDOZO, C.A.; MESQUITA, E.T.; RIMOLO, T.S.M. **Fatores de risco cardiovascular em pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (VIH).** Ver SOCERJ. 20(2):103-11, 2007.

ROSS, A.C.; ARMENTROUT, R.; O'RIORDAN, M.A. **Endothelial activation markers are linked to HIV status and are independent of antiretroviral therapy and lipotrophy.** J Acquir Immune Defic Syndr. 49:499–506, 2008.

ROSS A.C. et al. **Relationship between Inflammatory Markers, Endothelial Activation Markers, and Carotid Intima-Media Thickness in HIV-Infected Patients Receiving Antiretroviral Therapy.** Clinical Infectious Diseases. 49:1119–27, 2009.

SAMJI, H. et al. **Closing the gap: increases in life expectancy among treated HIV positive individuals in the United States and Canada.** PLoS One. 8(12):e81355, 2013.

SCHROECKSNADEL, S.; KURZ, K. **Immune activation and neuropsychiatric symptoms in human immunodeficiency virus type 1 infection.** Neurobehav HIV Med. :1–13, 2012.

SUDANO, I.; SPIEKER, L.E.; NOLL, G. **Cardiovascular disease in HIV infection.** Am Heart J. 151:1147-55, 2006.

SANTOS, G.G.C. **Política e Sexualidade: refletindo sobre as respostas governamentais à AIDS na África do Sul e no Brasil.** Physis. 19 (2): 283-300, 2009.

SEN, S.; RABINSTEIN, A.A.; ELKIND, M.S.; POWERS, W.J. **Recent developments regarding human immunodeficiency virus infection and stroke.** Cerebrovasc Dis. 33(3):209–218, 2012.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. **IV Diretriz Brasileira sobre dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia.** Arq Bras Cardiol.88, Supl I, 2007.

SOLAGES, A.; VITA, J.A.; THORNTON D.J. **Endothelial function in HIV-infected persons.**Clin Infect Dis. 42: 1325–1332, 2006.

SOUZA, S.J.; LUZIA, L.A.; SANTOS, S.S.; RONDÓ P.H. Lipid profile of HIV-infected patients in relation to antiretroviral therapy: a review. Rev Assoc Med Bras. 59(2):186–198, 2013.

TABIB, A.; LEROUX, C.; MORNEIX, J.F.; LOIRE, R. **Accelerated coronary atherosclerosis and arteriosclerosis in young human-immunodeficiency-virus–positive patients.** Coron Artery Dis. 11:41–6, 2000.

THAKORE, A.H.; GUO, C.Y.; LARSON, M.G. **Association of multiple inflammatory markers with carotid intimal medial thickness and stenosis (from the Framingham Heart Study).**Am J Cardiol. 99:1598–602, 2007.

TENORIO, A.R.; ZHENG, Y.; BOSCH, R.J. **Soluble markers of inflammation and coagulation but not T-cell activation predict non-AIDS-defining morbid events during suppressive antiretroviral treatment.**J. InfectDis. 210(8):1248–1259, 2014.

TROMBINI, E.S.; SCHERMANN, L.B.**Prevalência e fatores associados à adesão de crianças na terapia antirretroviral em três centros urbanos do Sul do Brasil.** CiêncSaúdeColetiva. 15(2):419-25, 2010.

TRIAANT, V.A.; MEIGS, J.B.; GRINSPOON, S.K. **Association of C-reactive protein and HIV infection with acute myocardial infarction.**JAcquir Immune DeficSyndr. 51(3):268–273, 2009.

TSAO, C.H et al. **Interleukin-4 regulates lipid metabolism by inhibiting adipogenesis and promoting lipolysis.** J Lipid Res. 55(3):385–397, 2014.

UNAIDS, **global statistics**,2016

WANG, D. et al.**Microvascular endothelial dysfunction and enhanced thromboxane and endothelial contractility in patients with HIV.** J AIDS Clin Res. 4(12):1–19, 2014.

WILSON, D.P. et al. **Relation between HIV viral load and infectiousness: a model-based analysis.** *HIV Lancet.* 372: 314–20, 2008.

WILLERSON, J.T.; RIDKER, P.M. **Inflammation as a cardiovascular risk factor.** *Circulation.* 109(21 suppl. 1):II2–II10, 2004.

YOUNG, J. et al. **Lipid profiles for antiretroviral-naive patients starting PI- and NNRTI-based therapy in the Swiss HIV cohort study.** *Antivir Ther.* 10: 585-591, 2005.

YOUNG, J.L.; LIBBY, P.; SCHONBECK, U. **Cytokines in the pathogenesis of atherosclerosis.** *Thromb. Haemost.* 88, 554-567, 2002.

***APÊNDICE***

**APÊNDICE A- VERSÃO DO ARTIGO EM INGLÊS**

O artigo será submetido à revista BMC Infectious Diseases

---

INFLAMMATORY MEDIATORS AND ASSOCIATION WITH CAROTIDAL  
THICKNESS BETWEEN PEOPLE LIVING WITH HIV USING ANTIRETROVIRAL AND  
WITH A LOW CARDIOVASCULAR RISK

Kaliene Maria Estevão Leite<sup>1</sup>; Heloísa Ramos Lacerda de Melo<sup>1</sup>; Gerson Gomes dos Santos Junior<sup>1</sup>; Emmanuelle Tenório Albuquerque Madruga Godoi<sup>1</sup>, Adriana Ferraz de Vasconcelos<sup>1</sup>; Virgínia Maria Barros Lorena<sup>2</sup>; Paulo Sérgio Ramos de Araujo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

<sup>2</sup> Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (CPqAM), Laboratório de Imunologia, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, PE, Brasil

\*Correspondência: [Helramos@terra.com.br](mailto:Helramos@terra.com.br)

Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Depto de Medicina Clínica, Bloco A do Hospital das Clínicas da UFPE

Avenida Moraes Rêgo, 1235. CEP: 50670-901, Recife

---

## ABSTRACT

**Background:** Individuals with HIV infection are at increased risk of developing cardiovascular disease when compared to the general population. This is due to the inflammation caused by HIV, the use of antiretroviral therapy and traditional risk factors. However, few studies have observed the occurrence of these disorders in the HIV-positive population, considered low cardiovascular risk and with undetectable viral load. The objective was to evaluate the association between the levels of inflammatory mediators with carotid thickening in people living with HIV, in treatment with antiretrovirals (NRTIs and NNRTIs) and with low cardiovascular risk, in addition to comparing intima-media thickness of carotid and mediator levels Inflammation among people with and without HIV.

**Methods:** To determine the low cardiovascular risk, in both groups, HIV and non-HIV was calculated using the Framingham risk score. Inflammatory markers (IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , ss-CRP, sVCAM-1 and sICAM-1) were measured by flow cytometry as well as Carotid artery by Doppler ultrasound.

**Results:** Among the groups, there were differences when comparing the inflammatory markers IFN- $\gamma$ , IL-1 and TNF- $\alpha$ . A higher level of these markers is observed in the non-HIV group. In the HIV group, the factors associated with the change in the thickness of the mean intimal carotid complex were age and smoking. In the group without HIV age, higher total cholesterol and LDL levels were associated with increased carotid thickness. From the calculation of P75, in the multivariate analysis in HIV patients, there was a significant association between levels of TNF- $\alpha$  and IL1- $\beta$  at a higher chance of atherosclerosis.

**Conclusions:** Thus, it is concluded that both groups present a similar risk of developing cardiovascular disease. The importance of viral load control in HIV-positive patients is added together with the maintenance of cardiovascular risk parameters under control, such as smoking, diabetes, hypertension and dyslipidemia, as well as image examination in the HIV positive population aged  $\geq 40$ .

**Keywords:** HIV. Inflammation. Cardiovascular disease. Antiretroviral Therapy.

## **BACKGROUND**

Efforts to control the HIV epidemic are currently focused on early diagnosis of infection and treatment of people living with HIV / AIDS (PLHA), as well as on the implementation of combined prevention interventions. The strategy to treat PLHA as a preventive measure requires not only the timely diagnosis of the infection, but also the investment in improving the continuous care of these individuals [1,2].

Increased longevity in PLHA due to effective and available antiretroviral therapy (ART) has brought non communicable chronic diseases, such as cardiovascular disease (CVD) [3]. According to studies conducted, virus and ART are factors that favor an increase in inflammatory mediators and Carotid thickening [4,5]. HIV-infected women have high levels of C-reactive protein (CRP), which is associated with atherosclerosis and an increased risk of myocardial infarction. Levels of IL-6, tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), IL-1, intracellular adhesion molecule (sICAM) and vascular cell adhesion molecule (sVCAM) of CVD, are also increased in this population [6,7,8].

However, studies did not evaluate these factors in the population considered low cardiovascular risk, which presents a low pre-disposition to cardiovascular disorders, thus not being observed what would actually be the possible effect of the inflammation caused by the virus and the toxic effect of the drug. In addition, a population in which all patients had undetectable viral load and only used the Nucleoside Analogue Reverse Transcriptase Inhibitor (NRTI) and Nucleoside Non-Analog Reverse Transcriptase Inhibitor (NNRTI) schemes were not studied. Since it is known that protease inhibitors (PIs) have a high effect on cardiovascular disorders.

Thus, the present study evaluated the inflammatory mediators IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , hs-CRP, sVCAM-1 and 1sICAM-1 and associated with íntima-média thickness (IMT) of carotid in people living with HIV, of antiretrovirals NRTIs and NNRTIs and with low cardiovascular risk, with low risk being determined by the Framingham risk score (FRS). In addition, we compare the mean carotid thickness of the carotid artery and levels of inflammatory mediators between people with and without HIV.

## **METHODS**

### **Study Design**

A cross-sectional, analytical study was performed at the Clinical Hospital of the Federal University of Pernambuco / Recife-PE, Brazil. The association between inflammatory

mediators and carotid thickening has been described in the population of patients living with HIV using antiretrovirals and with low cardiovascular risk. In addition to assessing whether there is a difference in the levels of inflammatory biomarkers and measurements of the average thickness of the carotid artery between people living with and without HIV.

### **Population and Place of Study**

A convenience sample of 115 patients was used, of whom 99 individuals with HIV and 16 without HIV, aged between  $\geq 18$  and  $\leq 60$  years, of both sexes. In addition to the diagnosis of HIV infection, patients with the virus should be using a regimen with 2 NRTIs + 1 NNRTI, initiated at any time from its diagnosis and undetectable viral load. The low risk for cardiovascular disease was also an inclusion criterion for both groups, and was calculated by the Framingham Risk Score. FRS estimates the likelihood of myocardial infarction or death from coronary disease within 10 years in individuals without prior clinical atherosclerosis. It uses parameters such as sex, age, total cholesterol and HDL cholesterol, systolic blood pressure and smoking to calculate risk [9].

HIV patients were part of the hospital's Specialized HIV / AIDS Care Service, and non-HIV-positive individuals were caretakers of patients seen at the hospital's Urology service. For the inclusion of the groups, similar questionnaires were carried out, being taken from the questionnaire for the group without HIV, only the questions related to the virus.

### **Data Collect**

After the patient signed the Informed Consent Term, data were collected through a standardized questionnaire, information on patients' charts and form of examinations, where results of measurements of carotid thickness, lipidogram and levels of inflammatory biomarkers were recorded. At the moment of inclusion of the patient, blood was collected for lipidogram and dosage of inflammatory biomarkers, blood pressure measurement, and carotid Doppler ultrasound.

### **Dosage of Inflammatory Mediators**

The dosages of the inflammatory mediators (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, sVCAM-1 and sICAM-1) were performed by Cytometric Bead Array (CBA), sera and marker patterns of the kit Were incubated with capture microspheres coated with marker-specific antibodies and the phycoerythrin (PE) labeled detection antibody, which provides a fluorescent signal in proportion to the amount of the bound analyte. After the incubations, 1 ml of the wash

solution was added and centrifuged for 10 minutes at 1100 rpm. The supernatant was discarded and with 300  $\mu$ l of the wash solution, the samples were resuspended for the flow cytometer dosages, the results being generated in tabular and graphical format using the BD CBA Software FCAP Array, version 3.01. The hs-CRP was measured by the Latex Immunoturbidimetry technique, in which the C-reactive protein reacts with the specific antibody forming insoluble immunocomplexes.

### **Measurements of Intima-Media Thickness of Carotid**

IMT measurements were performed using a GE-branded ultrasound device, model LOGIQe BT12. The device has DICOM 3.0 software and Auto IMT, with automatic image, well monitored. The examinations were performed by two examiners, two qualified vascular surgeons with specialization in Vascular Ultrasound, issued by the Brazilian Society of Angiology and Vascular Surgery. Measurements were made on the posterior wall of the studied vessel in a plate-free area and were defined as the distance between two echogenic lines represented by the lumen-intima and the adventitia-media interface of the arterial wall. The mean of the automatic measurement of the thickened common carotid artery was defined as either right or left. The IMT was considered thickened if  $IMT > 0.61$ , from the calculated 75 percentile of the population studied. The 75th percentile calculation is performed for each population to be studied, since it is based on the sex, race and age of the patient. The basis for this calculation was the table of IMT measures of the Elsa-Brazil study. The presence of plaque was considered when IMT thickening  $> 1.5$ mm was demonstrated [10, 11, 12].

### **Statistical Analysis**

Statistical analyzes were performed using the STATA software, version 11.0. In all tests, the significance level adopted was  $p \leq 0.05$ . The qualitative variables were expressed through absolute and relative frequencies, and quantitative through descriptive statistics, such as: mean, standard deviation, median, 25th and 75th percentile, and the student's t test was applied. For the tests of association of the qualitative measures the Pearson test was applied. The nonparametric Kruskal-Wallis test was used to compare the medians. Correlation analysis was performed using the Spearman coefficient.

## **RESULTS**

A total of 99 HIV-positive and 16 non-HIV-infected patients participated in the study. Of those with HIV, 59.6% were 40 years of age or older. For non-virus carriers (75.0%) they were 40 years old or older. Comparing the characteristics of the groups, there were differences when comparing the inflammatory markers IFN- $\gamma$ , IL-1 and TNF- $\alpha$ . A higher level of these markers is observed in the control group. Regarding IMT means, no significant difference was found between groups (Table 1).

The distribution of gender, smoking and diabetes were similar among the comparison groups. Regarding the laboratory measures, two variables had limiting significance in the comparison of HIV and non-HIV: mean HDL levels were higher among HIV patients, while mean LDL was lower in this group. Regarding the time of ART in the group of HIV patients, 37% had less than 5 years of antiretroviral treatment, while 29.3% had between 5 and 10 years of therapy and 33.7% had more than 10 years of therapy. Regarding CD4 and viral load levels at admission to the study, 90.5% had CD4 levels above 350 cells and all had undetectable viral load, the latter parameter was mandatory at inclusion. Of the antiretroviral class ITRN used by the patients, 98 (98.98%) used lamivudine, 65 (65.65%) zidovudine, 32 (32.32%) tenofovir, and 3 (3.03%) didanosine. Of the antiretroviral class ITRNN, 93 (93.93%) used efavirenz and 6 (6.06%) nevirapine (Table 1).

**Table 1. Comparison between HIV and non-HIV patient groups regarding biological characteristics, risk factors for cardiovascular disease, inflammatory mediators, IMT measures, and HIV-related factors**

Characteristics	Groups		p-value
	HIV (n = 99)	Non HIV (n = 16)	
<b>Age<sup>a</sup></b>	42,2 ± 8,9	48,7 ± 9,1	<b>0,007</b>
<b>Age group</b>			
< 40 years	40 (40,4%)	4 (25,0%)	0,239
40 years and over	59 (59,6%)	12 (75,0%)	
<b>Sex</b>			
Female	39 (39,4%)	4 (25,0%)	0,404
Male	60 (60,6%)	12 (75,0%)	
<b>Smoking</b>			
Yes	12 (12,1%)	0 (-)	0,213
No	87 (87,9%)	16 (100%)	
<b>Diabetes</b>			
Yes	3 (3,0%)	0 (-)	1,000
No	96 (97,0%)	16 (100%)	
<b>Laboratory Measures</b>			
Total cholesterol <sup>a</sup>	184,0 ± 35,4	190,37 ± 48,9	0,528
HDL <sup>a</sup>	50,3 ± 14,2	43,6 ± 7,8	<b>0,069</b>
LDL <sup>a</sup>	105,3 ± 27,2	118,5 ± 38,2	<b>0,093</b>

Triglycerides <sup>a</sup>	116,2 (79,6; 176)	120,1 (90,1; 191,3)	0,695
<b>Measure of carotid medointimal thickening</b>			
Mean thickening <sup>a</sup>	0,573 ± 0,123	0,586 ± 0,116	0,697
<b>Inflammatory mediators</b>			
PCR US	0,1 (0; 0,4)	0,1 (0; 0,3)	0,680
ICAM-1	0 (0; 0)	0 (0; 0)	1,000
VCAM-1(x10 <sup>-3</sup> )	12,12 (11,42; 12,62)	12,94 (10,59; 13,47)	<b>0,071</b>
IFN	2,16 (1,98; 2,40)	2,67 (2,29; 2,91)	<b>0,002</b>
IL-1	2,87 (2,87; 2,87)	2,87 (2,87; 4,08)	<b>0,027</b>
IL-6	2,1 (2,1; 2,1)	2,1 (2,1; 2,1)	0,689
TNF-α	2,26 (2,26; 2,26)	2,26 (2,26; 7,55)	<b>0,005</b>
<b>HAART time</b>			
Less than 5 years	34 (37,0%)	-	-
From 5 to less than 10 years	27 (29,3%)	-	-
10 years or more	31 (33,7%)	-	-
<b>CD4 Classification</b>			
Less than 200	2 (2,1%)	-	-
200 to 349	7 (7,4%)	-	-
350 or more	86 (90,5%)	-	-
<b>Use of Antiretrovirals</b>			
Lamivudine	98 (98,98%)		
zidovudine	65 (65,65%)		
Tenofovir	32 (32,32%)		
Didanosine	3 (3,03 %)		
Efavirenz	93 (93,93%)		
Nevirapine	6 (6,06%)		

<sup>a</sup> Mean ± SD - Student's t-test was applied

<sup>b</sup> Median (P25; P75) - applied the Kruskal-Wallis test

When calculated percentile 75 for the 115 patients studied, the value was 0.61 mm, therefore IMT was considered thickened if > 0.61 mm. The presence of IMT ≥ P75 in the HIV group was 51.51%; of these, 78.4% were 40 years or older; for the non-HIV group, the presence of IMT ≥ P75 was 56.25, of which 88.9 % of these patients ≥ 40 years, showing that older age is associated with increased carotid thickness. The smoking condition showed a borderline association (p = 0.082) indicating a possible greater thickness measure among smokers. Higher total cholesterol and LDL levels were associated with IMT ≥ P75 in the non-HIV group. (Table 2).

**Table 2. Association of factors related to carotid medial thickness as stratified according to the condition of HIV infection**

Factors	HIV patients			Non-HIV Patients		
	< P <sub>75</sub>	≥ P <sub>75</sub>	p-value	< P <sub>75</sub>	≥ P <sub>75</sub>	p-value
<b>Age<sup>a</sup></b>	37,9 ± 7,1	46,3 ± 8,5	<b>&lt;0,001</b>	44,0 ± 9,8	52,4 ± 7,0	<b>0,063</b>
<b>Age group</b>						
< 40 years	29 (60,4%)	11 (21,6%)	<b>&lt;0,001</b>	3 (42,9%)	1 (11,1%)	0,192
40 years and over	19 (39,6%)	40 (78,4%)		4 (57,1%)	8 (88,9%)	
<b>Sex</b>						
Female	19 (39,6%)	20 (39,2%)	0,970	2 (28,6%)	2 (22,2%)	0,608
Male	29 (60,4%)	31 (60,8%)		5 (71,4%)	7 (77,8%)	
<b>Smoking</b>						
Yes	3 (6,3%)	9 (17,7%)	<b>0,082</b>	0 (-)	0 (-)	-
No	45 (93,7%)	42 (82,3%)		7 (100%)	9 (100%)	
<b>Diabetes</b>						
Yes	1 (2,1%)	2 (3,9%)	0,594	0 (-)	0 (-)	-
No	47 (97,9%)	49 (96,1%)		7 (100%)	9 (100%)	
<b>Laboratory Measures</b>						
Total cholesterol <sup>a</sup>	178,1 ± 33,8	199,9 ± 58,3	0,395	175,7 ± 31,5	191,8 ± 37,4	0,023
HDL <sup>a</sup>	41,5 ± 9,8	45,2 ± 5,9	0,362	50,4 ± 17,6	50,1 ± 10,3	0,931
LDL <sup>a</sup>	110,9 ± 23,3	124,4 ± 47,4	0,504	98,5 ± 21,7	111,4 ± 30,2	0,020
Triglycerides <sup>b</sup>	113 (72; 181)	118 (86; 174)	0,459	117 (86; 169)	122 (101; 200)	0,560
<b>Inflammatory mediators<sup>b</sup></b>						
PCR US	0,1 (0; 0,4)	0,1 (0; 0,4)	0,966	0,1 (0; 0,6)	0,1 (0; 0,1)	0,581
ICAM-1 <sup>c</sup>	-	-	-	-	-	-
VCAM-1(x10 <sup>-3</sup> )	12,1 (11,3; 12,6)	12,0 (11,4; 12,6)	0,931	13,0 (6,6; 13,6)	12,9 (10,8; 13,4)	1,000
IFN	2,16 (1,98; 2,37)	2,21 (1,93; 2,43)	0,481	2,91 (1,96; 3,24)	2,66 (2,32; 2,72)	0,368
IL-1	2,87 (2,87; 2,87)	2,87 (2,87; 2,87)	1,000	2,87 (2,87; 4,40)	2,87 (2,87; 3,77)	0,597
IL-6 <sup>c</sup>	-	-	-	-	-	0,149
TNF-α	2,26 (2,26; 2,26)	2,26 (2,26; 2,26)	0,328	2,26 (2,26; 6,75)	2,26 (2,26; 13,7)	0,634
<b>HAART time</b>						
Less than 5 years	19 (43,2%)	15 (31,2%)	0,383	-	-	-
From 5 to less than 10 years	13 (29,5%)	14 (29,2%)		-	-	-
10 years or more	12 (27,3%)	19 (39,6%)		-	-	-

<sup>a</sup> P<sub>75</sub> do IMT = 0,61

<sup>a</sup> Mean ± standard deviation - student t test

<sup>b</sup> Median (P25; P75) - Mann-Whitney test

<sup>c</sup> There is no variation (all values equal to the minimum)

In the multivariate analysis in HIV patients, after the analysis was adjusted for age, smoking and cholesterol, there was a significant association with TNF-α levels, where increased levels of TNF-α were associated with a higher chance of atherosclerosis, as well as increased IL1-β levels presented a greater chance of atherosclerosis with a p value close to significance (Table 3).

**Table 3. Association of the factors related to carotid medial thickness, in multivariate analysis, stratified according to the condition of HIV infection.**

Mediadores Inflamatórios <sup>c</sup>	HIV patients		Pacientes Não HIV	
	IMT > P <sub>75</sub> OR (IC 95%) <sup>a</sup>	p-value	IMT > P <sub>75</sub> OR (IC 95%) <sup>b</sup>	p-value
PCR US	1,17 (0,45 – 2,98)	0,747	0,31 (0,02 – 5,31)	0,425
VCAM-1(x10 <sup>-3</sup> )	0,54 (0,21 -1,38)	0,197	1,08 (0,07 – 17,4)	0,954
IFN	1,76 (0,69 – 4,51)	0,238	Não calculado	0,175
IL-1	10,4 (0,71 – 151,2)	<b>0,087</b>	6,14 (0,24 – 156)	0,272
TNF-α	31,2 (2,70 – 361)	<b>0,006</b>	3,06 (0,12 – 79,3)	0,500

<sup>a</sup>Adjusted for age and smoking

<sup>b</sup>Adjusted for age and total cholesterol

<sup>c</sup> Analysis considering the median value of the markers

## DISCUSSION

This is the first study we know of in the HIV-positive population, where we evaluated biomarkers of inflammation by associating the presence of mean carotid intima-media thickness in subjects considered to be at low cardiovascular risk by the Framingham risk score, using only the antiretroviral classes ITRN and NNRTI and with undetectable viral load. This population presents a low pre-disposition to cardiovascular disorders, being possible to be observed with greater clarity possible effect of the inflammation provoked by the HIV or disorders provoked by the use of these classes of antiretrovirals.

In the evaluation of inflammatory biomarkers, a higher level of IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  was found in the non-HIV group when compared to the HIV group, for the markers IL-6, hs-CRP, sVCAM-1 and sICAM -1, no difference was observed in the level of these biomarkers between the comparison groups. These data are in contrast to those of Ross et al, in which levels of the inflammatory markers TNF- $\alpha$ , hs-CRP, IL-6 and sVCAM-1 were significantly higher in the HIV-infected group than the virus [4]. Bethan et al also observed higher levels of IL-6 and HIV-1 in HIV-positive compared to controls [13]. Our study excluded patients with detectable viral load, which is a contributing factor for the increase of these markers in the body, since the studies cited did not use the detectable viral load as exclusion criterion, and this may have been an influential factor in the disagreement of the results. A retrospective study of samples obtained from plasma donors before, during and after HIV acquisition demonstrated elevations in various cytokines during viral expansion [14]. Another study reports that initiation of ART in chronic infection is associated with a decline in the circulating levels of cytokines, including IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ , possibly by reducing viral load [15]. In addition, we observed that patients have been under antiretroviral

therapy for > 5 years, and therefore have had virological control for a long time, possibly reversing the repercussions of the virus on carotid thickening and inflammatory markers. Another hypothesis for our outcome may have been the greater age in the non-HIV group, since age is a contributing factor for increased levels of inflammatory markers and atherosclerosis.

As for laboratory measures, mean HDL levels were higher and lower than the mean LDL in the HIV group compared to the non-HIV group. The means of triglyceride and total cholesterol did not present significant difference between the HIV and non-HIV groups. However, higher levels of total and LDL cholesterol were associated with  $IMT \geq P75$  in the non-HIV group. Previous studies diverge in relation to lipidogram measurements. In the study by Ross et al, the HIV-infected group had lower mean HDL, but total cholesterol, triglycerides and LDL were similar between the groups. LDL and triglyceride levels were positively correlated with IMT [4]. In Nguemaim et al, seropositives had significantly higher triglyceride values and lower values of total cholesterol, HDL and LDL compared to the non-HIV group [16]. This divergence of results between studies is still unclear, but a study in Nigeria showed that triglyceride levels were inversely correlated with CD4 counts and positively correlated with viral load [17]. Our result may be justified by the higher mean age in patients without HIV, since it was significant. It is known that HDL levels decrease with age, while LDL and total cholesterol levels rise. The most frequent male sex among non-HIV patients, although not part of the analysis, may also have contributed to this difference. Finally, patients under constant medical consultation, medical surveillance, and lifestyle modification guidelines may have contributed to this finding.

Corroborating with the literature, this study reinforces that age  $\geq 40$  years, smoking and diabetes are factors associated with altered measurement of mediointimal thickness of carotid artery, thus increasing the risk of developing cardiovascular disease.

The means of IMT measurements showed no statistically significant difference when compared to the mean of patients with and without HIV. Lorenz et al, in a previous study, had demonstrated a higher mean IMT in the HIV group when compared to the control mean without the virus [18]. However the population of our study is considered low cardiovascular risk by the calculation of the Framingham risk score and this may justify our result. In the study by Falcão et al, patients classified as having medium or high cardiovascular risk according to the Framingham score were 3.7 times more likely to present atherosclerosis than patients considered to be at low risk [19]. In another study, patients with subclinical atherosclerosis had a higher risk score compared to those with normal mid-normal thickness.

For every 10% increase in the Framingham risk score, the odds of having an abnormal IMT tripled [20].

When evaluating the association between inflammatory markers and IMT, from the calculation of P75, in the multivariate analysis in HIV patients, there was a significant association with TNF- $\alpha$  levels, where increased levels of TNF- $\alpha$  were associated with a greater chance of atherosclerosis, as well as increased IL1- $\beta$  levels presented a greater chance of atherosclerosis with a p value close to significance. These data disagree with Falcão et al who found no association between inflammatory markers (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , us-CRP, sVCAM-1 and 1sICAM-1) and carotid intimal thickening [19]. A study by Ssinabulya et al found similar results, in which high levels of hs-CRP were not associated with IMT [20]. However, in the other two studies, higher IMT was associated with higher levels of IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$ , ss-CRP and sVCAM-1 [4, 5]. Both our study and the others cited have a small sample size, being necessary studies with larger sample size, that can confirm more accurately the relation between inflammatory markers and the occurrence of carotid atherosclerosis.

Our result can be explained by the careful selection of our patients. Both are attended at a referral center in the treatment of HIV, having a good medical follow-up. Our sample evaluates an "ideal" patient, that is, that has an undetectable viral load, probably a long time ago, since the ART time is  $\geq 5$  years in 63% of the patients and without previous or current use of Protease Inhibitor. In addition, the calculation for the Framingham risk score for cardiovascular disease is low.

These data point to the importance of patient awareness work among health professionals, guiding them and controlling risk factors such as smoking, diabetes, hypertension and dyslipidemia. This implies that HIV treatment centers need to offer resources that can identify patients at risk for early intervention. Laboratory tests to test levels of markers that predict cardiovascular risk as well as imaging are necessary in the HIV-positive population, especially in patients aged  $\geq 40$  years and with more than ten years of ART.

We had as a limitation, narrow sample size for the non-HIV group and the highest mean age in this population, however our results bring important data to the literature, which may serve as support for future research.

## CONCLUSIONS

HIV-positive individuals with undetectable viral load considered to be at low risk for developing cardiovascular disease and using NRTI and NNRTI medications, presented a similar risk to people without the virus developing subclinical atherosclerosis. The inflammatory markers IL-6, hs-CRP, VCAM-1 and sICAM-1 showed similar levels in the studied groups and IFN- $\gamma$ , IL-1 and TNF- $\alpha$  had lower levels in the HIV population. When evaluating the association between inflammatory markers and IMT, from the calculation of P75, in the multivariate analysis in HIV patients, the markers TNF- $\alpha$  and IL1- $\beta$  were shown to be associated with a greater chance of atherosclerosis. Age, smoking, and higher total cholesterol and LDL levels all contributed to carotid thickening. Therefore our study shows promising results and demonstrates that the control of viral load with NRTIs and NNRTI plus the maintenance of parameters of cardiovascular risk under control, such as smoking, diabetes, hypertension and dyslipidemia, result in the patient with HIV with a good cardiovascular prognosis and a lower risk of subclinical atherosclerosis, compared to the risk of the general population.

## LIST OF ABBREVIATIONS

**PLHA:** People living with HIV / AIDS. **ART:** Antiretroviral therapy. **CVD:** Cardiovascular disease. **CRP:** C-reactive protein. **TNF- $\alpha$ :** Tumor necrosis factor alpha. **IFN- $\gamma$ :** Interferon gamma. **sICAM:** Intracellular adhesion molecule. **sVCAM:** Vascular cell adhesion molecule. **NRTI:** Nucleoside Analogue Reverse Transcriptase Inhibitor Nucleoside. **NNRTI:** Non-Analog Reverse Transcriptase Inhibitor. **PIs:** Protease inhibitors. **FRS:** Framingham risk score. **CBA:** Cytometric Bead Array. **IMT:** Intima-Media Thickness.

## DECLARATIONS

### Acknowledgements

Not applicable.

### Funding

This research was financed by the National Council of Scientific and Technological Development – CNPq.

### **Availability of data and materials**

All data generated or analyzed during this study are included in this published article.

### **Authors' contributions**

Conceptualized the study: KMEL, HRLM, GGSJ, PSRA; Data collection: KMEL, GGSJ; Performing the imaging tests: ETAMG, AFV; Performance of the experiments: KMEL, GGSJ, VMBL; Data analysis: KMEL, HRLM, GGSJ; Writing of the manuscript: KMEL; All authors read and approved the final manuscript.

### **Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

### **Consent for publication**

Not applicable.

### **Ethics approval and consent to participate**

Study participants were included after signing the Free and Informed Consent Form. Approval was obtained by the ethics committee of the Federal University of Pernambuco. A copy of the ethical approval statement is available for review by the magazine's editor.

## **REFERENCES**

1. MONTANER, J.S. **Treatment as prevention: toward an AIDS-free generation.** Top Antivir Med. Jul-Aug, 2013; 21(3):110-4.
2. UNAIDS, **global statistics**, 2016
3. WORLD HEALTH ORGANIZATION, **Global Health Observatory Data: Antiretroviral therapy (ART) coverage among all age groups**, 2015
4. ROSS A.C. et al. **Relationship between Inflammatory Markers, Endothelial Activation Markers, and Carotid Intima-Media Thickness in HIV-Infected Patients Receiving Antiretroviral Therapy.** Clinical Infectious Diseases. 2009; 49:1119–27.

5. KAPLAN, R.C. et al. **Potential cardiovascular disease risk markers among HIVinfected women initiating antiretroviral treatment.** *J. Acquir Immune Defic Syndr.* August, 2012; 1, 60(4): 359–368.
6. HSUE, P.Y. et al. **Carotid Intima-Media Thickness Progression in HIV Infected Adults Occurs Preferentially at the Carotid Bifurcation and Is Predicted by Inflammation.** *J Am Heart Assoc.* 2012.
7. LIBBY P. **Inflammation and cardiovascular disease mechanisms.** *Am J Clin Nutr.* 2006; 83(2):456S–460S.
8. TRIANT, V.A.; MEIGS, J.B.; GRINSPOON, S.K. **Association of C-reactive protein and HIV infection with acute myocardial infarction.** *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2009; 51:268–73.
9. SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. **IV Diretriz Brasileira sobre dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia.** *Arq Bras Cardiol.* 88, Supl I, 2007.
10. GODOI, E.T. et al. **Antirretroviral therapy effect in the intima-medio complex and ankle-brachial index in patients infected by HIV.** *J Vasc Bras.* 2012; 11(2):123-31.
11. GODOI, E.T. et al. **Assessment of intima-media complex in carotid, femoral and right subclavian arteries for early investigation of atherosclerosis in HIV-infected patients.** *Radiol Bras.* 2013; 46(6):333-40.
12. FREIRE, C.M. et al. **Recomendação para a quantificação pelo ultrassom da doença aterosclerótica das artérias carótidas e vertebrais: grupo de trabalho do departamento de imagem cardiovascular da Sociedade Brasileira de Cardiologia – DIC – SBC.** *Arq Bras Cardiol.* 2015; 28(nº especial):e1-e64.
13. BETHAN MCDONALD. et al. **Persistently Elevated Serum Interleukin-6 Predicts Mortality Among Adults Receiving Combination Antiretroviral Therapy in Botswana: Results from a Clinical Trial.** *AIDS Res Hum Retroviruses.* Jul, 2013; 29(7): 993–999.

14. STACEY, A.R. et al. **Induction of a striking systemic cytokine cascade prior to peak viremia in acute human immunodeficiency virus type 1 infection, in contrast to more modest and delayed responses in acute hepatitis B and C virus infections.** *J. Virol.* 2009;83:3719–3733.
15. HAISSMAN, J.M. et al. **Plasma cytokine levels in Tanzanian HIV-1-infected adults and the effect of antiretroviral treatment.** *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2009; 52:493–497.
16. NGUEMAÏM, N.F. et al. **Serum lipid profile in highly active antiretroviral therapy-naive HIV-infected patients in Cameroon: a case-control study.** *HIV Med.* 2010; 11:353–9.
17. KUTI, M.A. et al. **Dyslipidemia in ART-Naive HIV-Infected Persons in Nigeria-Implications for Care.** *J Int Assoc Provid AIDS Care.* 14:355–9. 2015; doi: 10.1177/2325957414555227.
18. LORENZ, M.W. et al. **Both long-term HIV infection and highly active antiretroviral therapy are independent risk factors for early carotid atherosclerosis.** *Atherosclerosis* . 2008; 196:720–6.
19. FALCÃO, M.D.A. et al. **Association of biomarkers with atherosclerosis and risk for coronary artery disease in patients with HIV.** *Arq Bras Cardiol.* Nov, 2012; 99(5):971-8. Epub Oct 18.
20. SSINABULYA. I. et al. **Subclinical Atherosclerosis among HIV-Infected Adults Attending HIV/AIDS Care at Two Large Ambulatory HIV Clinics in Uganda.** Published onlin Feb 28. doi: 10.1371/ journal.pone.0089537, 2014.

## APÊNDICE B – Formulário de Inclusão de Pacientes

**FORMULÁRIO DE INCLUSÃO DE PACIENTE****ENSAIO CLÍNICO – ATORVASTATINA/AAS**

Nome \_\_\_\_\_

Código \_\_\_\_\_ Data entrada \_\_\_\_\_ Registro \_\_\_\_\_

**CRITÉRIOS DE INCLUSÃO:**

- 1) Idade entre  $\geq 18$  e  $\leq 50$  anos? S  N
- 2) Uso de esquemas que utilizem 2 Inibidores da Transcriptase Reversa Análogo de Nucleosídeos (ITRN) + 1 Inibidor da Transcriptase Reversa Não Análogo de Nucleosídeo (NIN) S  N
- 3) Uso de TARV entre 6 a 18 meses S  N
- 4) Baixo Risco Cardiovascular S  N
- Escore de Risco de Framingham \_\_\_\_\_%

**CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO**

- 1) Histórico de internação hospitalar e/ou infecções oportunistas nos últimos 90 dias ? S  N
- 2) Histórico de disfunção hepática crônica? S  N
- 3) Disfunção tireoidiana? S  N
- 4) Doença auto-imune (lúpus, artrite, etc.)? S  N
- 5) Histórico de hepatite B ou C? S  N
- 6) Gravidez ou amamentação? S  N

- 7) **Uso atual ou até 6 meses antes de:**estatinas, fibratos, ezetemibe, ômega 3, AAS, antiinflamatórios, anticoagulantes orais, interferon, interleucinas, hormônio do crescimento, imunoglobulinas, glicocorticoides (inclusive os de uso intranasal) ou outros imunossupressores (ciclosporina, metotretaxe, azatioprina, etc.)  
 N  S
- 8) Uso atual de: Ciclosporina, eritromicina, cetoconazol, metotrexato, digoxina, hipoglicemiantes orais, antiagregantesplaquetários, ácido valpróico?  
 S  N
- 9) Abuso de álcool? S  N

Vc já sentiu necessidade de parar de beber? S N

Vc já se sentiu chateado por pessoas que criticam seu hábito de beber? S N

Vc já se sentiu culpado por beber? S N

Vc já bebeu álcool de manhã para acordar? S N

2 Respostas SIM indicam abuso de álcool.

Mayfield etal.The CAGE Questionnaire 1974.

10) Prévia intolerância a estatinas e/ou AAS? S  N

11) Hemofilia? S  N

12) TGO e TGP  $\geq$  120 UI/L, CPK  $\geq$  167 U/L ? S  N

V Diretriz Bras. de Dislipidemias e prevenção da Aterosclerose. SBC 2013.

13) Trauma muscular recente ou cirurgia realizada até 4 meses anteriormente?

S  N

14) Histórico de doença cardiovascular, gastrite, diabetes, câncer e disfunção renal?

S

APÊNDICE C – Formulário Primeira Consulta

Formulário 1ª Consulta ENSAIO CLÍNICO – ATORVASTATINA/AAS

Nome \_\_\_\_\_

Código \_\_\_\_\_ Data entrada \_\_\_\_\_ Registro \_\_\_\_\_

TEL. CONTATO \_\_\_\_\_ OP \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ OP \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ OP \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ OP \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_ OP \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ OP \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ OP \_\_\_\_\_

e-mail \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

Endereço Completo \_\_\_\_\_

Fund. Incom	<input type="checkbox"/>	Sup. Incom	<input type="checkbox"/>
Fund. Compl	<input type="checkbox"/>	Sup Compl	<input type="checkbox"/>
Médio Incom	<input type="checkbox"/>	Pós grad.	<input type="checkbox"/>
Médio Compl	<input type="checkbox"/>		(IBGE – 2009)

BR	<input type="checkbox"/>
PAR	<input type="checkbox"/>
PRE	<input type="checkbox"/>
AM	<input type="checkbox"/>
IN	<input type="checkbox"/>
(IBGE 2009)	

Idade \_\_\_\_\_ Sexo \_\_\_\_\_ Escolaridade \_\_\_\_\_

Raça \_\_\_\_\_

Data Diagnóstica da infecção HIV \_\_\_\_\_ Data de Início TARV \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Esquema de TARV em uso \_\_\_\_\_

Uso atual de Outros medicamentos? S  N  (Descrever na tabela abaixo)

Medicamento	Dose	Posologia	Via	Indicação	Data início	Data término

Condições oportunistas prévias \_\_\_\_\_

Tabagismo atual? S  N  tempo \_\_\_\_\_ Etilismo atual? S  N  Quantas X por semana? \_\_\_\_\_

Drogas ilícitas atual? S  N  Qual? \_\_\_\_\_

História de Dças anteriores \_\_\_\_\_ Diabetes S  N  HAS S  N  Dislipid S  N

Dças cardiovasculares? S  N  Qual? \_\_\_\_\_

Antecedentes familiares de doenças cardiovasculares? S  N

Pai  Mãe  Avô  Avó  Tios  Irmãos  Outros \_\_\_\_\_

## APÊNDICE D – Ficha de registro de resultados de exames de imagem

## RESULTADOS DE IMAGEM

EXAME	SEM 0	SEM 12	SEM 24
	Data ___/___/___	Data ___/___/___	Data ___/___/___
IMT Dir.	Máx.	Máx.	Máx.
	Média	Média	Média
IMT Esq.	Máx.	Máx.	Máx.
	Média	Média	Média
BD Antes	Int.	Int.	Int.
	Ext.	Ext.	Ext.
BD Após	Int.	Int.	Int.
	Ext.	Ext.	Ext.
BE Antes	Int.	Int.	Int.
	Ext.	Ext.	Ext.
BE Após	Int.	Int.	Int.
	Ext.	Ext.	Ext.

## APÊNDICE E - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Convido o (a) Sr.(a) para participar, como voluntário (a), da pesquisa :

**“Efeito da Atorvastatina e Atorvastatina/AAS versus Placebo em Pacientes com HIV em uso de Antirretrovirais e com Baixo Risco Cardiovascular na função endotelial e na inflamação: um Ensaio Clínico Randomizado Duplo Cego.”**

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: GERSON GOMES DOS SANTOS JUNIOR

TELEFONE: (82) 8886-3495

E-MAIL gergomes@yahoo.com.br

PESQUISADORA PARTICIPANTE: HELOÍSA RAMOS LACERDA DE MELO

TELEFONE: (81)2126-3902 (81) 9213-3885

E-MAIL helramos@terra.com.br

KALIENE MARIA ESTEVÃO LEITE

TELEFONE: (81) 98270270

EMAIL: kaliene\_pe@hotmail.com

Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado (a) de forma alguma. Em caso de dúvida você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: **(Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, Sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).**

### **INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:**

Você está sendo convidado(a) para participar desta pesquisa porque é paciente que faz tratamento no ambulatório do Serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da UFPE ou do Hospital Oswaldo Cruz da UPE. Este documento é chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, que contém informações sobre a pesquisa. Após ler este Termo e discutir suas dúvidas com a equipe responsável pelo estudo, você decidirá se

quer ou não participar. Se quiser, você duas testemunhas e um dos pesquisadores assinarão e datarão duas vias deste documento. Uma delas ficará com você e outra ficará arquivada com os pesquisadores.

É importante que você saiba que sua participação é totalmente voluntária. Você pode decidir participar ou não, a qualquer momento sem prejuízo algum para o seu acompanhamento médico ou para o seu tratamento.

### **Por que esta pesquisa está sendo feita e quais são os objetivos?**

A Pesquisa está sendo realizada para saber se o uso diário de alguns medicamentos podem reduzir a inflamação causada pelo vírus HIV e pelos medicamentos usados no seu tratamento. Se a inflamação puder ser reduzida, o risco com futuros problemas cardíacos e vasculares também pode ser reduzido e ajudar aos portadores do vírus HIV a prevenir certas doenças.

### **O que eu deverei fazer se decidir participar da pesquisa?**

Durante seis meses além dos medicamentos que toma para controlar o vírus HIV, você terá que tomar mais dois medicamentos por dia. A cada mês durante os seis meses terá que vir receber os medicamentos e responder um questionário sobre o uso e os efeitos destes medicamentos. O preenchimento deste questionário poderá exigir até meia hora do seu tempo.

Você terá que fazer exames de sangue, antes de iniciar os medicamentos, no primeiro, no terceiro e no sexto mês da pesquisa.

Você terá que fazer exames de ultrassom nas veias do braço, antes do iniciar os medicamentos, no terceiro e no sexto mês da pesquisa.

Uma grupo de pacientes vai usar Atorvastatina 10 a 20 mg 1 comprimido por dia. Outro grupo usará Atorvastatina 10 a 20mg 1 comprimido por dia + Ácido Acetil Salicílico 100mg 1 comprimido por dia. O último grupo vai tomar cápsulas de amido de milho (maisena), para que os pesquisadores possam comprovar se o medicamento faz ou não o efeito esperado. O paciente receberá uma quantidade de 60 comprimidos para tomar durante o mês e não pode saber se está tomando medicamento de verdade ou cápsulas de maisena.

### **Quantas pessoas participarão da pesquisa?**

Serão 132 pessoas portadoras do HIV e que usam medicamentos para controlar o vírus. A participação é voluntária.

### **Quanto tempo durará a pesquisa?**

Aproximadamente dois anos, mas a sua participação será de apenas seis meses.

### **Eu corro algum risco por participar deste estudo?**

Os medicamentos do estudo já são receitados pelos médicos para a população em geral. A Atorvastatina é usada normalmente para baixar o colesterol e triglicerídeos. O Ácido Acetil Salicílico é usado para tratar inflamações e prevenir formação de trombos (afinar o sangue). Raramente causam efeitos colaterais, mas eles podem acontecer, e os que mais ocorrem são sangramento, dor no estômago e no músculo. Caso ocorra algum destes efeitos você deve falar quando vier para o acompanhamento mensal, ou entrar em contato a qualquer momento do dia ou da noite com os pesquisadores ou os médicos que estarão lhe acompanhando. O acompanhamento mensal também servirá para prevenir ou evitar os efeitos colaterais.

### **Eu terei algum benefício por participar deste estudo?**

Os resultados poderão ser de utilidade para melhorar o tratamento das pessoas portadoras do vírus HIV.

Sua participação neste estudo não interferirá no tratamento que você está recebendo nem no acompanhamento habitual que realiza no hospital.

Além disso você terá benefícios diretos com a sua participação, como acompanhamento mais próximo dos profissionais que fazem parte do Serviço e da equipe de pesquisadores, maior número de consultas, melhor detecção de problemas e dificuldades relativas à sua patologia com conseqüentemente maior resolutividade, acesso a exames médicos altamente especializados e de alto custo não disponíveis na rede pública e/ou privada.

### **Eu receberei algum dinheiro pela participação neste estudo?**

A participação é voluntária, as pessoas não serão remuneradas em dinheiro.

### **Terei despesas por participar desta pesquisa?**

Você não terá nenhuma despesa por participar deste estudo. Os medicamentos exames e consultas, assim como qualquer atendimento não será pago pelo voluntário.

### **Minhas informações pessoais serão divulgadas?**

Os dados do estudo são confidenciais e apenas terão acesso a eles os pesquisadores envolvidos no estudo, o pessoal autorizado que analisará os dados, o Comitê de Ética que aprova a realização da pesquisa (Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da UFPE).

Nenhum resultado desta pesquisa divulgará dados pessoais que possam identificá-lo(a). Os resultados desta pesquisa serão analisados e possivelmente publicados em revistas médicas, mas em momento algum seu nome será exposto ou divulgado. Toda a informação será registrada de forma anônima .

Este material será arquivado de forma a garantir acesso restrito aos pesquisadores envolvidos, e será guardado por cinco anos. Depois dos 5 anos os formulários serão destruídos (queimados).

As informações somente poderão ser divulgadas de forma anônima e serão mantidas nos computadores e arquivos da sala do grupo de pesquisa (Epidemiologia, manifestações clínicas da infecção pelo HIV/Aids, complicações da terapia anti-retroviral e resistência viral na infecção pelo HIV/Aids), localizada no oitavo andar do Hospital das Clínicas /UFPE – Av. Prof. Moraes Rego 1235, Cidade Universitária Recife (Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias-DIP), sob a responsabilidade da Profa. Dra. Heloísa Ramos Lacerda de Melo.

### **Quais as minhas alternativas caso não queira participar ou desista de participar deste estudo ?**

Se você não quiser participar deste estudo seu acompanhamento de saúde habitual continuará a ser feito no Serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da UFPE ou do Hospital Oswaldo Cruz da UPE. Você não deixará de receber nenhum cuidado disponível por não participar da pesquisa.

### **Quais são os meus direitos como voluntário(a) em uma pesquisa?**

A participação nesta pesquisa tem caráter voluntário e ainda que você decida participar, conserva a possibilidade de se retirar a qualquer momento e por qualquer motivo, sem

prejuízo algum para você. Esta decisão não afetará a sua relação com o seu médico/s nem o seu acesso a futuros tratamentos.

Caso você tenha alguma necessidade de ser atendido por complicações com o uso dos medicamentos, os médicos e os Hospitais envolvidos na pesquisa estarão a qualquer momento disponíveis para prestar seu atendimento.

Se decidir participar, será solicitado que você dê o seu consentimento por escrito assinando este documento.

#### **Quem devo procurar em caso de dúvidas?**

Se tiver alguma dúvida sobre sua participação nessa pesquisa ou sobre as informações contidas nesse termo de consentimento livre e esclarecido, favor entrar em contato com:

**Gerson Gomes dos Santos Junior**

**Heloísa Ramos Lacerda de Melo**

SERVIÇO DE DOENÇAS INFECCIOSAS

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UFPE, 8º. ANDAR

FONES: (81) 2126-3902 / (81) 9213-3885/ (82) 8886-3495

NOME E ASSINATURA DO PESQUISADOR

---

#### **CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO**

Eu, \_\_\_\_\_, RG/  
CPF/\_\_\_\_\_

abaixo assinado, concordo em participar do estudo como sujeito. Fui devidamente informado(a) e esclarecido(a) pelo(a) Pesquisador(a) \_\_\_\_\_ sobre a pesquisa, os procedimentos nelaenvolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento.

Local e data \_\_\_\_\_

Assinatura do voluntário ou responsável:

---

**Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a**

**pesquisa e aceite do sujeito em participar.**

02 testemunhas (imparciais)

Nome: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

## ANEXO A- Parecer da Comissão de Ética em Pesquisa do Centro de Ciência da Saúde-UFPE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
PERNAMBUCO CENTRO DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



Continuação do Parecer: 307.087

**Objetivo da Pesquisa:**

A pesquisa tem por objetivo geral avaliar a eficácia da Atorvastatina e da Atorvastatina + Aspirina versus placebo em pacientes portadores de HIV em uso de antirretrovirais e com baixo risco cardiovascular, em aumentar a dilatação fluxo-mediada da artéria braquial (DILA) e reduzir os níveis dos marcadores inflamatórios e lipídes e, por objetivos específicos: 1) descrever o efeito da Atorvastatina e da Atorvastatina + AAS comparados a placebo na dilatação fluxo-mediada da artéria braquial (DILA) e no diâmetro da artéria braquial em repouso entre pacientes com HIV em uso de TARV e com baixo risco cardiovascular.; 2) descrever o efeito da Atorvastatina e da Atorvastatina + AAS comparados a placebo nos níveis dos marcadores inflamatórios e nos níveis de lipídes entre pacientes com HIV em uso de TARV e com baixo risco cardiovascular; 3) descrever o efeito da Atorvastatina comparado a Atorvastatina + AAS na dilatação fluxo mediada da artéria braquial e no diâmetro da artéria braquial em repouso, assim como nos níveis de marcadores inflamatórios e de lipídes entre pacientes com HIV e uso de TARV com baixo risco cardiovascular.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os profissionais que prescrevem tais medicamentos já possuem uma larga experiência nos serviços que tratam portadores do HIV, assim como a utilização da Atorvastatina nas dosagens de 10 e 20 mg e AAS 100 são comuns nas clínicas de cardiologia que possuem também amplo conhecimento sobre os eventos adversos mais comuns. Eventos que possam vir a ocorrer serão diagnosticados rapidamente pela equipe da pesquisa conforme consta do protocolo. Considerando que as drogas antirretrovirais, reconhecidamente, têm contribuído para o aumento no risco de doenças cardiovasculares nesse grupo, o diagnóstico precoce através dos exames laboratoriais que serão realizados pelo protocolo constitui benefício para os sujeitos incluídos. Quanto à ocorrência de eventos outros adversos, os médicos envolvidos na pesquisa farão o atendimento do paciente a qualquer momento que seja necessário. Os números do telefone celular da equipe médica serão informados a todos os participantes que poderão entrar em contato, inclusive por ligação a cobrar. As estruturas dos Hospitais envolvidos no estudo também estarão disponibilizadas a qualquer momento para o atendimento dos pacientes envolvidos.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de um estudo importante que fará uma análise comparativa do uso da Atorvastatina isolada (10 e 20 mg) e Atorvastatina (10 e 20 mg) associada a 100 mg de AAS na redução do risco de doenças cardiovasculares em pacientes HIV+ em tratamento com medicamentos antirretrovirais. Reconhecidamente, as complicações cardiovasculares como IAM e AVC têm sido diagnosticadas com cada vez mais frequência em pacientes utilizando tais drogas.

**Endereço:** Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81)2126-8588 **Fax:** (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
PERNAMBUCO CENTRO DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Efeito da Atorvastatina e Atorvastatina/AAS versus Placebo em Pacientes com HIV em uso de Antirretrovirais e com Baixo Risco Cardiovascular na função endotelial e na inflamação: um Ensaio Clínico Randomizado Duplo Cego.

**Pesquisador:** Gerson Gomes dos Santos Junior

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 13097213.2.0000.5208

**Instituição Proponente:** CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

**Patrocinador Principal:** Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico ((CNPq))

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 307.087

**Data da Relatoria:** 18/06/2013

**Apresentação do Projeto:**

Trata-se de um Projeto de Pesquisa cuja finalidade é a obtenção do título Doutorado em Doenças Infecciosas da UFPE. Tem como Pesquisador principal Gerson Gomes dos Santos Júnior e como Pesquisadora Participante a Prof<sup>a</sup>. Dra. Heloisa Ramos Lacerda e mais um grupo composto por cinco pesquisadores. Será um Ensaio Clínico Randomizado, Controlado e Duplo Cego, de Fase II, que pretende avaliar o uso de Atorvastatina isolada comparada a Atorvastatina + Ácido Acetil Salicílico em pacientes portadores do HIV em uso de antirretrovirais e com baixo risco cardiovascular. Será realizado nos Serviços de Doenças Infecciosas dos Hospitais Oswaldo Cruz e Clínicas da UFPE, sendo estimada a inclusão de 132 sujeitos de ambos os sexos e faixa etária > 18 e < 50 anos. Os pacientes deverão estar em uso de antirretroviral com esquemas que utilizem 2 Inibidores da Transcriptase Reversa Análogo de Nucleosídeos (ITRN) + 1 Inibidor da Transcriptase Reversa Não Nucleosídeo (ITRNN) num período de tempo entre 6 a 18 meses e com baixo risco para doença cardiovascular segundo o Escore de Risco de Framingham - Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2007. Os pacientes serão randomizados em três grupos de intervenção: Atorvastatina, Atorvastatina+AAS e placebo e a coleta de dados está programada para início em 01/08/13 e término em 30/06/14.

**Endereço:** Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

**Bairro:** Cidade Universitária

**CEP:** 50.740-600

**UF:** PE

**Município:** RECIFE

**Telefone:** (81)2126-8588

**Fax:** (81)2126-8588

**E-mail:** cepccs@ufpe.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
PERNAMBUCO CENTRO DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



Continuação do Parecer: 307.087

Através do presente estudo os exames clínicos e laboratoriais poderão contribuir para esclarecer qual a melhor associação de drogas no controle das dislipidemias e do estado inflamatório ocasionado pelo HIV e/ou pelas drogas utilizadas para o seu controle.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os documentos de apresentação obrigatória (TCLE, cartas de anuência do Hospital Oswaldo Cruz e Hospital das Clínicas da UFPE, Folha de rosto, Currículo Lattes dos pesquisadores, carta de financiamento do CNPq, orçamento financeiro detalhado no valor de R\$ 92.000,00 e declaração de vínculo do pesquisador com a UFPE) foram anexados à Plataforma Brasil.

**Recomendações:**

Não se aplicas.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Atendeu a pendência justificando adequadamente o uso de placebo.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O Colegiado aprova o parecer do protocolo em questão e o pesquisador está autorizado para iniciar a coleta de dados.

Projeto foi avaliado e sua APROVAÇÃO definitiva será dada, após a entrega do relatório final, através da PLATAFORMA BRASIL ou por meio de ofício impresso emitido pelo Comitê de Ética em Pesquisa/UFPE.

**Endereço:** Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81)2126-8588 **Fax:** (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
PERNAMBUCO CENTRO DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



Continuação do Parecer: 307.087

RECIFE, 17 de Junho de 2013

---

**Assinador por:**  
**GERALDO BOSCO LINDOSO COUTO**  
(Coordenador)

**Endereço:** Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81)2126-8588 **Fax:** (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br

## ANEXO B- Normas de submissão à revista BMC Infectious Diseases

### Research article

#### Criteria

Research articles should report on original primary research, but may report on systematic reviews of published research provided they adhere to the appropriate reporting guidelines which are detailed in our editorial policies. Please note that non-commissioned pooled analyses of selected published research will not be considered.

*BMC Infectious Diseases* strongly encourages that all datasets on which the conclusions of the paper rely should be available to readers. We encourage authors to ensure that their datasets are either deposited in publicly available repositories (where available and appropriate) or presented in the main manuscript or additional supporting files whenever possible. Please see Springer Nature's information on recommended repositories. Where a widely established research community expectation for data archiving in public repositories exists, submission to a community-endorsed, public repository is mandatory. A list of data where deposition is required, with the appropriate repositories, can be found on the Editorial Policies Page.

Please note that for outbreak reports and intervention studies of nosocomial infection we endorse the ORION guidelines.

#### Preparing your manuscript

The information below details the section headings that you should include in your manuscript and what information should be within each section.

Please note that your manuscript must include a 'Declarations' section including all of the subheadings (please see below for more information).

#### Title page

The title page should:

- present a title that includes, if appropriate, the study design e.g.:
  - "A versus B in the treatment of C: a randomized controlled trial", "X is a risk factor for Y: a case control study", "What is the impact of factor X on subject Y: A systematic review"
  - or for non-clinical or non-research studies a description of what the article reports
- list the full names, institutional addresses and email addresses for all authors
  - if a collaboration group should be listed as an author, please list the Group name as an author. If you would like the names of the individual members of the Group to be searchable through their individual PubMed records, please include this information in the "Acknowledgements" section in accordance with the instructions below
- indicate the corresponding author

## Abstract

The Abstract should not exceed 350 words. Please minimize the use of abbreviations and do not cite references in the abstract. Reports of randomized controlled trials should follow the CONSORT extension for abstracts. The abstract must include the following separate sections:

- **Background:** the context and purpose of the study
- **Methods:** how the study was performed and statistical tests used
- **Results:** the main findings
- **Conclusions:** brief summary and potential implications
- **Trial registration:** If your article reports the results of a health care intervention on human participants, it must be registered in an appropriate registry and the registration number and date of registration should be stated in this section. If it was not registered prospectively (before enrollment of the first participant), you should include the words 'retrospectively registered'. See our editorial policies for more information on trial registration

## Keywords

Three to ten keywords representing the main content of the article.

## Background

The Background section should explain the background to the study, its aims, a summary of the existing literature and why this study was necessary or its contribution to the field.

## Methods

The methods section should include:

- the aim, design and setting of the study
- the characteristics of participants or description of materials
- a clear description of all processes, interventions and comparisons. Generic drug names should generally be used. When proprietary brands are used in research, include the brand names in parentheses
- the type of statistical analysis used, including a power calculation if appropriate

## Results

This should include the findings of the study including, if appropriate, results of statistical analysis which must be included either in the text or as tables and figures.

## **Discussion**

This section should discuss the implications of the findings in context of existing research and highlight limitations of the study.

## **Conclusions**

This should state clearly the main conclusions and provide an explanation of the importance and relevance of the study reported.

## **List of abbreviations**

If abbreviations are used in the text they should be defined in the text at first use, and a list of abbreviations should be provided.

## **Declarations**

All manuscripts must contain the following sections under the heading 'Declarations':

- Ethics approval and consent to participate
- Consent for publication
- Availability of data and material
- Competing interests
- Funding
- Authors' contributions
- Acknowledgements
- Authors' information (optional)

Please see below for details on the information to be included in these sections.

If any of the sections are not relevant to your manuscript, please include the heading and write 'Not applicable' for that section.

### ***Ethics approval and consent to participate***

Manuscripts reporting studies involving human participants, human data or human tissue must:

- include a statement on ethics approval and consent (even where the need for approval was waived)
- include the name of the ethics committee that approved the study and the committee's reference number if appropriate

Studies involving animals must include a statement on ethics approval.

See our editorial policies for more information.

If your manuscript does not report on or involve the use of any animal or human data or tissue, please state “Not applicable” in this section.

### ***Consent for publication***

If your manuscript contains any individual person’s data in any form (including individual details, images or videos), consent for publication must be obtained from that person, or in the case of children, their parent or legal guardian. All presentations of case reports must have consent for publication.

You can use your institutional consent form or our consent form if you prefer. You should not send the form to us on submission, but we may request to see a copy at any stage (including after publication).

See our editorial policies for more information on consent for publication.

If your manuscript does not contain data from any individual person, please state “Not applicable” in this section.

### ***Availability of data and materials***

All manuscripts must include an ‘Availability of data and materials’ statement. Data availability statements should include information on where data supporting the results reported in the article can be found including, where applicable, hyperlinks to publicly archived datasets analysed or generated during the study. By data we mean the minimal dataset that would be necessary to interpret, replicate and build upon the findings reported in the article. We recognise it is not always possible to share research data publicly, for instance when individual privacy could be compromised, and in such instances data availability should still be stated in the manuscript along with any conditions for access.

Data availability statements can take one of the following forms (or a combination of more than one if required for multiple datasets):

- The datasets generated and/or analysed during the current study are available in the [NAME] repository, [PERSISTENT WEB LINK TO DATASETS]
- The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.
- All data generated or analysed during this study are included in this published article [and its supplementary information files].
- The datasets generated and/or analysed during the current study are not publicly available due [REASON WHY DATA ARE NOT PUBLIC] but are available from the corresponding author on reasonable request.
- Data sharing is not applicable to this article as no datasets were generated or analysed during the current study.
- The data that support the findings of this study are available from [third party name] but restrictions apply to the availability of these data, which were used under license for the current study, and so are not publicly available. Data are however available from the authors upon reasonable request and with permission of [third party name].

- Not applicable. If your manuscript does not contain any data, please state 'Not applicable' in this section.

More examples of template data availability statements, which include examples of openly available and restricted access datasets, are available [here](#).

BioMed Central also requires that authors cite any publicly available data on which the conclusions of the paper rely in the manuscript. Data citations should include a persistent identifier (such as a DOI) and should ideally be included in the reference list. Citations of datasets, when they appear in the reference list, should include the minimum information recommended by DataCite and follow journal style. Dataset identifiers including DOIs should be expressed as full URLs. For example:

Hao Z, AghaKouchak A, Nakhjiri N, Farahmand A. Global integrated drought monitoring and prediction system (GIDMaPS) data sets. figshare. 2014. <http://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.853801>

With the corresponding text in the Availability of data and materials statement:

The datasets generated during and/or analysed during the current study are available in the [NAME] repository, [PERSISTENT WEB LINK TO DATASETS].<sup>[Reference number]</sup>

### ***Competing interests***

All financial and non-financial competing interests must be declared in this section.

See our editorial policies for a full explanation of competing interests. If you are unsure whether you or any of your co-authors have a competing interest please contact the editorial office.

Please use the authors initials to refer to each author's competing interests in this section.

If you do not have any competing interests, please state "The authors declare that they have no competing interests" in this section.

### ***Funding***

All sources of funding for the research reported should be declared. The role of the funding body in the design of the study and collection, analysis, and interpretation of data and in writing the manuscript should be declared.

### ***Authors' contributions***

The individual contributions of authors to the manuscript should be specified in this section. Guidance and criteria for authorship can be found in our editorial policies.

Please use initials to refer to each author's contribution in this section, for example: "FC analyzed and interpreted the patient data regarding the hematological disease and the transplant. RH performed the histological examination of the kidney, and was a major contributor in writing the manuscript. All authors read and approved the final manuscript."

### ***Acknowledgements***

Please acknowledge anyone who contributed towards the article who does not meet the criteria for authorship including anyone who provided professional writing services or materials.

Authors should obtain permission to acknowledge from all those mentioned in the Acknowledgements section.

See our editorial policies for a full explanation of acknowledgements and authorship criteria.

If you do not have anyone to acknowledge, please write "Not applicable" in this section.

Group authorship (for manuscripts involving a collaboration group): if you would like the names of the individual members of a collaboration Group to be searchable through their individual PubMed records, please ensure that the title of the collaboration Group is included on the title page and in the submission system and also include collaborating author names as the last paragraph of the "Acknowledgements" section. Please add authors in the format First Name, Middle initial(s) (optional), Last Name. You can add institution or country information for each author if you wish, but this should be consistent across all authors.

Please note that individual names may not be present in the PubMed record at the time a published article is initially included in PubMed as it takes PubMed additional time to code this information.

### ***Authors' information***

This section is optional.

You may choose to use this section to include any relevant information about the author(s) that may aid the reader's interpretation of the article, and understand the standpoint of the author(s). This may include details about the authors' qualifications, current positions they hold at institutions or societies, or any other relevant background information. Please refer to authors using their initials. Note this section should not be used to describe any competing interests.

### **Endnotes**

Endnotes should be designated within the text using a superscript lowercase letter and all notes (along with their corresponding letter) should be included in the Endnotes section. Please format this section in a paragraph rather than a list.

### **References**

All references, including URLs, must be numbered consecutively, in square brackets, in the order in which they are cited in the text, followed by any in tables or legends. The reference numbers must be finalized and the reference list fully formatted before submission.

Examples of the BioMed Central reference style are shown below. Please ensure that the reference style is followed precisely.

See our editorial policies for author guidance on good citation practice.

Web links and URLs: All web links and URLs, including links to the authors' own websites, should be given a reference number and included in the reference list rather than within the text of the manuscript. They should be provided in full, including both the title of the site and the URL, as well as the date the site was accessed, in the following format: The Mouse Tumor Biology Database. <http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do>. Accessed 20 May 2013. If an author or group of authors can clearly be associated with a web link (e.g. for blogs) they should be included in the reference.

### Example reference style:

**Article** *within* *a* *journal*  
Smith JJ. The world of science. Am J Sci. 1999;36:234-5.

**Article** *within* *a* *journal* *(no* *page* *numbers)*  
Rohrman S, Overvad K, Bueno-de-Mesquita HB, Jakobsen MU, Egeberg R, Tjønneland A, et al. Meat consumption and mortality - results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. BMC Med. 2013;11:63.

**Article** *within* *a* *journal* *by* *DOI*  
Slifka MK, Whitton JL. Clinical implications of dysregulated cytokine production. Dig J Mol Med. 2000; doi:10.1007/s801090000086.

**Article** *within* *a* *journal* *supplement*  
Frumin AM, Nussbaum J, Esposito M. Functional asplenia: demonstration of splenic activity by bone marrow scan. Blood 1979;59 Suppl 1:26-32.

**Book** *chapter,* *or* *an* *article* *within* *a* *book*  
Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. In: Bourne GH, Danielli JF, Jeon KW, editors. International review of cytology. London: Academic; 1980. p. 251-306.

OnlineFirst chapter in a series (without a volume designation but with a DOI)  
Saito Y, Hyuga H. Rate equation approaches to amplification of enantiomeric excess and chiral symmetry breaking. Top Curr Chem. 2007. doi:10.1007/128\_2006\_108.

**Complete** *book,* *authored*  
Blenkinsopp A, Paxton P. Symptoms in the pharmacy: a guide to the management of common illness. 3rd ed. Oxford: Blackwell Science; 1998.

**Online** *document*  
Doe J. Title of subordinate document. In: The dictionary of substances and their effects. Royal Society of Chemistry. 1999. <http://www.rsc.org/dose/title of subordinate document>. Accessed 15 Jan 1999.

**Online** **database**  
 Healthwise Knowledgebase. US Pharmacopeia, Rockville. 1998. <http://www.healthwise.org>.  
 Accessed 21 Sept 1998.

**Supplementary** **material/private** **homepage**  
 Doe J. Title of supplementary material. 2000. <http://www.privatehomepage.com>. Accessed 22  
 Feb 2000.

**University** **site**  
 Doe, J: Title of preprint. <http://www.uni-heidelberg.de/mydata.html> (1999). Accessed 25 Dec  
 1999.

**FTP** **site**  
 Doe, J: Trivial HTTP, RFC2169. <ftp://ftp.isi.edu/in-notes/rfc2169.txt> (1999). Accessed 12  
 Nov 1999.

**Organization** **site**  
 ISSN International Centre: The ISSN register. <http://www.issn.org> (2006). Accessed 20 Feb  
 2007.

**Dataset** **with** **persistent** **identifier**  
 Zheng L-Y, Guo X-S, He B, Sun L-J, Peng Y, Dong S-S, et al. Genome data from sweet and  
 grain sorghum (Sorghum bicolor). GigaScience Database. 2011.  
<http://dx.doi.org/10.5524/100012>.

## **Figures, tables additional files**

See General formatting guidelines for information on how to format figures, tables and additional files.

Submit your manuscript in Editorial Manage