

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DANIELLE CRISTYANE KALVA BORATO

**BIOMARCADORES DE TRANSLOCAÇÃO MICROBIANA, INFLAMAÇÃO E
RISCO CARDIOVASCULAR EM INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HIV**

PONTA GROSSA

2019

DANIELLE CRISTYANE KALVA BORATO

**BIOMARCADORES DE TRANSLOCAÇÃO MICROBIANA, INFLAMAÇÃO E
RISCO CARDIOVASCULAR EM INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HIV**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção de grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas, Curso de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia, da UEPG

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Rebuglio Velloso

PONTA GROSSA

2019

B726

Borato, Danielle Cristyane Kalva

Biomarcadores de translocação microbiana, inflamação e risco cardiovascular em indivíduos infectados pelo HIV / Danielle Cristyane Kalva Borato Ponta Grossa, 2019.

79 f.

Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Rebuglio Velloso.

1. Translocação microbiana. 2. Inflamação. 3. Risco cardiovascular. 4. HIV. 5. Biomarcadores. I. Velloso, José Carlos Rebuglio. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia. III.T.

CDD: 616.979.2

Ponta Grossa, 26 de fevereiro de 2019.

ATA DE EXAME DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS-ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E BIOCIÊNCIAS APLICADAS À FARMÁCIA NÚMERO 01/2019 DA DOUTORANDA DANIELLE CRISTYANE KALVA BORATO REALIZADA NO DIA 26 DE FEVEREIRO DE 2019, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos vinte e seis dias de fevereiro de dois mil e dezenove, às 14h00min, no auditório do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – sala 115 - Bloco M, da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em sessão pública sob a presidência do Professor Doutor José Carlos Rebuglio Velloso reuniu-se a Banca Examinadora de exame de defesa de tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas da doutoranda Danielle Cristyane Kalva Borato na linha de pesquisa: Avaliação Clínico/Laboratorial de Processos Fisiopatológicos, constituída pelos Professor Doutor José Carlos Rebuglio Velloso(UEPG/PR), demais Doutores (membros titulares): Gustavo Henrique Frigieri Vilela(BrainCare), Fábio André dos Santos(UEPG/PR), Vanessa Cristina Godoy Jasinski (CESCAGE/PR) e Andrea Timóteo dos Santos Dec(UEPG/PR). Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e ao candidato das normas que regem o exame de defesa de tese de Doutorado e definiu - se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição.

O título do trabalho foi: **“BIOMARCADORES DE TRANSLOCAÇÃO MICROBIANA, INFLAMAÇÃO E RISCO CARDIOVASCULAR EM INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HIV.”**

Encerrado a defesa, a banca pronunciou-se APROVANDO a tese, considerado como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas. O aluno deverá entregar, no prazo de até 30 dias, a versão definitiva da tese de Doutorado, com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Observações (se necessário): _____

Alteração de título: sim ☐ não ☒

Novo título: _____

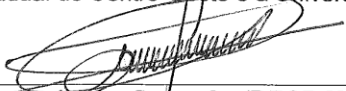

José Carlos Rebuglio Velloso 1 - (DECLIN - UEPG) Presidente

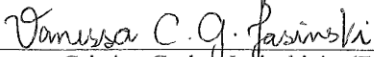

Gustavo Henrique Frigieri Vilela 2 - (BRAIN CARE) – Titular

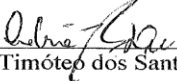


**Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas Programa de
Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas**
Associação Ampla entre a
Universidade Estadual do Centro-Oeste e a Universidade Estadual de Ponta




Fábio André dos Santos 3 - (DEODON - UEPG) – Titular


Vanessa Cristina Godoy Jasinski 4 - (FARMÁCIA - CESCAGE) – Titular


Andrea Timóteo dos Santos Dec - (DECLIN - UEPG) – Titular

Este trabalho recebeu financiamento da Fundação Araucária, tendo sido contemplado na Chamada Publica 09/2016 – Programa Institucional de Pesquisa Básica e Aplicada, Fundação Araucária, protocolo UEPG n. 16106, convênio 09/2017

RESUMO

A doença cardiovascular está classificada como uma das principais morbidades e causas de mortalidade em indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). Evidências indicam que tanto a inflamação sistêmica quanto a ativação imune crônica estão relacionadas com o aumento do risco cardiovascular. Alguns estudos sugerem que estes mecanismos podem ser desencadeados pela translocação microbiana a partir do intestino para a circulação sanguínea, devido à perda de integridade da mucosa durante a progressão da infecção pelo HIV. A identificação do risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares utilizando biomarcadores solúveis apresenta-se como uma importante ferramenta para auxiliar os médicos no tratamento precoce de indivíduos infectados pelo HIV. Portanto, este estudo apresentou como objetivo investigar as possíveis relações entre os biomarcadores de translocação microbiana, inflamação e risco cardiovascular em indivíduos infectados pelo HIV. Esta pesquisa foi dividida em duas etapas. Na primeira etapa foi realizado uma revisão sistemática, com a finalidade de: **i)** sintetizar a evidência disponível na literatura sobre os mais utilizados biomarcadores solúveis de translocação microbiana, inflamação e risco cardiovascular e **ii)** avaliar as possíveis associações entre eles em indivíduos infectados pelo HIV. Com base nos resultados da revisão sistemática foi desenvolvida a estratégia de pesquisa para segunda etapa desta tese de doutorado. Na segunda etapa foi realizado um estudo quantitativo com coleta de sangue venoso e análises laboratoriais dos indivíduos infectados pelo HIV. Essa etapa do trabalho apresentou como critério avaliar os biomarcadores plasmáticos em indivíduos infectados pelo HIV em diferentes situações: **i)** potencial risco do desenvolvimento de doenças cardiovasculares; **ii)** estado imunológico; **iii)** esquema terapêutico utilizado e **iv)** tempo de infecção pelo HIV. Os resultados do presente estudo demonstraram consideráveis relações entre os biomarcadores que podem ser inseridos no diagnóstico do laboratório clínico, visando a interligação entre translocação microbiana, inflamação e risco cardiovascular. A Proteína C Reativa-ultrassensível (PCR-us) foi o biomarcador que apresentou maior associação com os outros biomarcadores, tanto na revisão sistemática como na pesquisa quantitativa. Porém, os níveis plasmáticos de mieloperoxidase (MPO) não apresentaram nenhuma relação com os biomarcadores de translocação microbiana (diretos e indiretos). Portanto, estudos longitudinais prospectivos são necessários para inserção das relações entre esses biomarcadores no acompanhamento laboratorial dos indivíduos infectados pelo HIV.

Palavras-chave: Translocação microbiana. Inflamação. Risco cardiovascular. HIV. Biomarcadores.

ABSTRACT

Cardiovascular disease is classified as a major cause of morbidity and mortality in HIV-infected individuals. Evidence indicates that systemic inflammation and chronic immune activation are related to increased cardiovascular risk. Some studies have suggested that these mechanisms can be triggered by microbial translocation products from the gut to the systemic circulation, due to damage on intestinal epithelium, during the progression of HIV infection. The identification of the risk for the development of cardiovascular diseases using soluble biomarkers proves to be an important tool to assist physicians in the early treatment of HIV-infected individuals. Therefore, this study aimed to investigate the possible relationships between the biomarkers of microbial translocation, inflammation and cardiovascular risk in HIV-infected individuals. This research was divided into two stages. In the first stage a systematic review was carried, with the purpose of: **i)** synthesize the available evidence in the literature on the most widely used soluble biomarkers of microbial translocation, inflammation and cardiovascular risk and **ii)** evaluate the possible associations between them in HIV-infected individuals. Based on the results of the systematic review, the research strategy for the second stage of this doctoral thesis was developed. In the second stage, a quantitative study was performed with venous blood collection and laboratory tests of HIV-infected individuals. This stage of the work presented as a criterion to evaluate the plasma biomarkers in HIV infected individuals in different situations: **i)** risk of developing cardiovascular disease; **ii)** immunological status; **iii)** therapeutic regimen used and **iv)** time of HIV infection. The results of the present study demonstrated considerable relationships among the biomarkers that can be inserted in the diagnosis of the clinical laboratory, aiming at the interconnection between microbial translocation, inflammation and cardiovascular risk. High sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) was the biomarker that showed a greater association with the other biomarkers, both in the systematic review and in the quantitative research. However, the plasma levels of myeloperoxidase (MPO) had no relation with the biomarkers of microbial translocation (direct and indirect). Therefore, prospective longitudinal studies are necessary for the insertion of the relationships between these biomarkers in the laboratory follow-up of HIV-infected individuals.

Keywords: Microbial translocation. Inflammation. Cardiovascular risk. HIV. Biomarkers.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema dos mecanismos envolvidos na translocação microbiana	13
Figura 2 - Fluxograma da seleção dos estudos	23
Figura 3 - Níveis de evidência científica	24
Figura 4 - Número de estudos que avaliaram os biomarcadores de translocação microbiana, inflamação e risco cardiovascular.....	30
Figura 5 - Associação entre o biomarcador de translocação microbiana sCD14 e os biomarcadores de inflamação e risco cardiovascular	31
Figura 6 - Associação entre o biomarcador de translocação microbiana LPS e os biomarcadores de inflamação e risco cardiovascular	32
Quadro 1 - Diluição do controle padrão de endotoxinas para realização da curva-padrão	40
Quadro 2 - Diluição do padrão de LBP humano para realização da curva-padrão	41
Quadro 3 - Diluição do padrão de CD14 humano para realização da curva-padrão	42
Quadro 4 - Diluição do calibrador MPO humano para realização da curva-padrão	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização dos artigos selecionados para análise	27
Tabela 2 - Caracterização dos indivíduos infectados pelo HIV e biomarcadores de translocação microbiana, inflamação e risco cardiovascular.....	28
Tabela 3 - Caracterização dos indivíduos infectados pelo HIV avaliados no estudo.....	49
Tabela 4 – Caracterização dos indivíduos infectados pelo HIV e avaliação dos biomarcadores de acordo com os níveis plasmáticos de PCR-us	54
Tabela 5 - Caracterização dos indivíduos infectados pelo HIV e avaliação dos biomarcadores de acordo com os níveis plasmáticos de MPO	55
Tabela 6 - Caracterização dos indivíduos infectados pelo HIV e biomarcadores de acordo com a contagem absoluta de células T CD4+	57
Tabela 7 - Caracterização dos indivíduos infectados pelo HIV e biomarcadores de acordo com o esquema terapêutico	59
Tabela 8 - Caracterização dos indivíduos infectados pelo HIV e biomarcadores de acordo com o tempo de infecção pelo HIV	60
Tabela 9 - Correlação entre os biomarcadores plasmáticos em indivíduos infectados pelo HIV	61

LISTA DE SIGLAS

ACTG	<i>AIDS Clinical Trial Group</i>
ADMA	Dimetilarginina Assimétrica (do inglês, <i>Asymmetric Dimethylarginine</i>)
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (do inglês, <i>acquired immunodeficiency syndrome</i>)
DCV	Doença Cardiovascular
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (do inglês, <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
EndoCAb	Anticorpo do Núcleo da Endotoxina (do inglês, <i>Endotoxin core antibody</i>)
FvW	Fator de von Willebrand
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana (do inglês, <i>Human Immunodeficiency Vírus</i>)
I-FABP	Proteína de ligação a ácidos graxos intestinais (do inglês, <i>Intestinal Fatty Acid Binding Protein</i>)
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina-6
IP	Inibidor de Protease
IP-10	Interferon proteína indutível γ 10
LAL	Lisado de Amebócitos de <i>Límulus</i>
LBP	Proteína de Ligação a LPS (do inglês, <i>LPS Binding Protein</i>)
LPS	Lipopolissacarídeos
MPO	Mieloperoxidase
OxLDL	Colesterol LDL oxidado
PCR	Proteína C Reativa
PCR-us	Proteína C Reativa-ultra sensível
rDNA	DNA bacteriano ribossomal
sCD14	CD14 solúvel
sCD163	CD163 solúvel
SDMA	Dimetilarginina Simétrica (do inglês, <i>Symmetric Dimethylarginine</i>)
sFT	Fator Tecidual solúvel
TARV	Terapia antirretroviral
TMAO	N-óxido de Trimetilamina (do inglês, <i>Trimethylamine-N-Oxide</i>)
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral-alfa (do inglês, <i>Tumor Necrosis Fator-alpha</i>)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1 RISCO CARDIOVASCULAR EM INFECTADOS PELO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV)	9
1.2 TRANSLOCAÇÃO MICROBIANA	11
1.3 BIOMARCADORES DE TRANSLOCAÇÃO MICROBIANA	14
1.4 BIOMARCADORES DE INFLAMAÇÃO E RISCO CARDIOVASCULAR	16
2. JUSTIFICATIVA.....	19
3. OBJETIVOS.....	20
3.1 OBJETIVO GERAL.....	20
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
4. DESENVOLVIMENTO	21
4.1 DELINEAMENTO DA PESQUISA.....	21
4.2 PRIMEIRA ETAPA: REVISÃO SISTEMÁTICA.....	21
4.2.1 <i>Materiais e métodos</i>	21
4.2.1.1 Revisão sistemática da literatura	21
4.2.1.2 Seleção dos estudos	22
4.2.1.3 Extração de dados.....	23
4.2.1.4 Análise crítica dos estudos incluídos.....	24
4.2.1.5 Análise dos resultados	24
4.2.2 <i>Resultados e Discussão</i>	25
4.3 SEGUNDA ETAPA: PESQUISA QUANTITATIVA	37
4.3.1 <i>Materiais e Métodos</i>	37
4.3.1.1 Delineamento do estudo	37
4.3.1.2 Coleta e Processamento da amostra biológica.....	39
4.3.1.3 Análise laboratorial	39
4.3.1.3.1 Biomarcador de Translocação Microbiana – Direto	39
4.3.1.3.2 Biomarcadores de Translocação Microbiana – Indiretos	41
4.3.1.3.3 Biomarcadores de Inflamação e Risco Cardiovascular	43
4.3.1.3.4 Biomarcadores Imunológicos.....	45
4.3.1.3.5 Biomarcador Viroológico.....	46
4.3.1.4 Avaliação estatística.....	47
4.3.2 <i>Resultados e Discussão</i>	47
5 CONCLUSÃO	62
REFERÊNCIAS	63
ANEXO A – PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DOS DADOS.....	71
ANEXO B – PARECER NÚCLEO DE EDUCAÇÃO PERMANENTE – NEP	73
ANEXO C – PARECER COMITE DE ÉTICA EM PESQUISA	75

1. INTRODUÇÃO

1.1 RISCO CARDIOVASCULAR EM INFECTADOS PELO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV)

A infecção pelo HIV continua a ser um grande problema de saúde pública, afetando 36,7 milhões de pessoas em todo mundo (WHO, 2018). O controle bem-sucedido da viremia na infecção pelo HIV com a terapia antirretroviral (TARV), converteu esta condição inevitavelmente fatal em uma patologia crônica (BAHRAMI et al., 2016). Atualmente, doenças relacionadas as infecções oportunistas não são mais o principal problema, mas uma série de novas complicações associadas ao HIV como as doenças não transmissíveis, especialmente as doenças cardiovasculares (DCV) (SHAN et al., 2018). Estima-se que até o ano de 2030, 73% dos indivíduos infectados pelo HIV apresentem 50 anos ou mais e 78% desenvolvam DCV (HSUE; WATERS, 2018).

Uma recente meta-análise com 80 estudos longitudinais envolvendo 793.635 indivíduos, com acompanhamento de 3,5 milhões de pessoas-ano; demonstrou que o risco relativo de DCV em indivíduos infectados pelo HIV é de 2,16 (IC 95%, 1,68–2,77) em comparação com indivíduos não infectados (SHAH et al., 2018). Portanto, a doença cardiovascular está classificada como uma das principais causas de morte nessa população, especialmente a doença arterial coronariana (DEMIR et al., 2018).

Indivíduos infectados pelo HIV exibem prevalência de um estilo de vida compatível para o desenvolvimento de DCV como: tabagismo, alcoolismo, toxicodependência e envelhecimento prematuro (NOU; LO; GRINSPOON, 2016). Além disso, a ativação crônica do sistema imune e a inflamação persistente associada ao HIV (consequente do efeito direto da replicação viral, das alterações metabólicas e antropométricas, da presença de coinfeções e da perda da integridade da mucosa intestinal), contribuem expressivamente para o aumento do risco cardiovascular nessa população (HSUE; DEEKS; HUNT, 2012).

Ao mesmo tempo, existe forte evidência da associação entre a depleção periférica de células T CD4⁺ e o risco aumentado de um evento cardiovascular, indivíduos com contagem inferior a 200 células/mm³ apresentam-se mais predispostos a um evento cardiovascular (KAPLAN et al., 2008). Além dos fatores tradicionais de risco para doenças cardiovasculares, a diminuição da contagem de células T CD4⁺ é o fator de risco mais importante para o aumento da aterosclerose subclínica em indivíduos infectados pelo HIV (KAPLAN et al., 2008).

Além do estilo de vida e da própria infecção pelo HIV, a toxicidade da TARV pode contribuir de forma indireta favorecendo os fatores de risco cardiovasculares tradicionais (i.e.

hipertensão arterial, dislipidemia, resistência à insulina e adiposidade central) ou diretamente atuando sobre o endotélio, favorecendo a inflamação e a disfunção endotelial (CALZA; MANFREDI; VERUCCHI, 2010). Estas alterações podem variar de acordo com a classe específica de antirretroviral, bem como medicamentos individuais dentro de uma classe (CURRIER et al., 2008). Além disso, a mudança das diretrizes de tratamento que recomendam o uso de TARV para todos os indivíduos infectados pelo HIV, independentemente da contagem de células T CD4 +, podem influenciar no risco do desenvolvimento das DCV (HANNA et al., 2015).

Portanto, interações complexas entre os fatores tradicionais de risco cardiovascular, a própria infecção pelo HIV e a exposição à TARV, estão relacionadas com o maior risco de desenvolver doenças cardiovasculares, como a aterosclerose (TRIAINT, 2012; ZANETTI et al., 2018). Porém, os mecanismos específicos do desenvolvimento da aterosclerose em indivíduos infectados pelo HIV ainda permanecem desconhecidos (KEARNS et al., 2017).

Evidências indicam que tanto a inflamação sistêmica quanto a ativação imune crônica estão relacionadas ao aumento do risco cardiovascular (GRINSPOON, 2014). Deve ser ressaltado que essas situações se manifestam em indivíduos infectados pelo HIV mesmo com a supressão viral sustentada pelo uso da TARV, e parecem prever fortemente os eventos cardiovasculares (HUNT, 2010). Alguns estudos sugerem que a inflamação sistêmica e a ativação imune crônica podem ser desencadeadas pela translocação microbiana a partir do intestino para a circulação sanguínea, devido à perda de integridade da mucosa durante a progressão da infecção pelo HIV (LIU et al., 2017; MARCHETTI; TINCATI; SILVESTRI, 2013).

Grinspoon e Boston (2018) propõem um novo paradigma para a aterogênese no HIV, no qual o aumento da ativação de monócitos e a imunidade inata contribuem para formação da placa vulnerável, inflamada e não calcificada, características específicas da aterosclerose na infecção pelo HIV. A ativação imunológica pode resultar do baixo nível de viremia em reservatórios persistentes, mesmo entre aqueles indivíduos que apresentam níveis circulantes indetectáveis da carga viral plasmática, ou da translocação microbiana devido à devastação do tecido imune, associado ao intestino, pelo HIV (GRINSPOON; BOSTON, 2018).

1.2 TRANSLOCAÇÃO MICROBIANA

Estima-se que 10 a 100 trilhões de microrganismos habitem o trato gastrointestinal humano (JI et al., 2018). Deste modo, a relação simbiótica, estabelecida entre a microbiota intestinal e o hospedeiro, desempenha um papel crucial na manutenção da saúde do indivíduo (JI et al., 2018). A barreira intestinal, em condições saudáveis, é geralmente muito dinâmica e eficaz, com o lado luminal infestado com uma grande variedade de microrganismos intestinais, enquanto o lado basolateral permanece virtualmente estéril (NAGPAL; YADAV, 2017).

No entanto, se o sistema imunológico da mucosa intestinal estiver comprometido e os mecanismos de defesa falharem, pode ocorrer a passagem não fisiológica de bactérias e/ou produtos bacterianos da luz do trato gastrointestinal para sítios estéreis, processo conhecido como translocação microbiana (BERG, 1995). Três mecanismos principais promovem a translocação bacteriana: i) supercrescimento bacteriano intestinal, ii) deficiências nas defesas imunológicas do hospedeiro e iii) aumento da permeabilidade ou dano à barreira da mucosa intestinal (BERG, 1995).

A disfunção imunológica observada durante a infecção pelo HIV está diretamente associada à intensa redução das células T CD4⁺ no sangue periférico e outros tecidos, incluindo a mucosa intestinal (GALVÃO-LIMA et al., 2017). Portanto, na infecção pelo HIV ocorre a destruição generalizada da função imune do hospedeiro incluindo uma profunda depleção de linfócitos T CD4⁺ (GOOTENBERG et al., 2017), principalmente as células Th17 e Th22, que são críticas na manutenção da integridade do intestino (DILLON; FRANK; WILSON, 2016; ROSADO-SÁNCHEZ et al., 2018). Essas células residem no tecido linfóide associado ao trato gastrointestinal e são responsáveis por estimular a proliferação de células epiteliais e recrutar neutrófilos para o local (HUNT, 2010). Consequentemente, são as principais células de defesa contra a translocação microbiana (HUNT, 2010). Assim sendo, está claro que a infecção pelo HIV resulta em danos severos à mucosa intestinal com prejuízo à barreira epitelial e depleção de subgrupos de células T CD4⁺ (Th17 e Th22), críticos para a manutenção da homeostase intestinal (LIU et al., 2017).

Deste modo, esse defeito estrutural na barreira intestino-sangue em indivíduos infectados pelo HIV, permite a translocação de produtos microbianos para a circulação, causando endotoxemia (SANDLER; DOUEK, 2012). Isto é, presença no sangue periférico de lipopolissacarídeos (LPS), componente bacteriano que tem sido associado com a inflamação sistêmica e ao acionamento contínuo do sistema imune (ANCUTA et al., 2008).

A primeira linha de defesa contra a translocação microbiana é realizada por elementos da camada de muco dentro do lúmen do trato gastrointestinal: proteínas, fosfolipídios, eletrólitos e água. Além disso, as imunoglobulinas A (IgA) locais podem se ligar e eliminar bactérias, limitando assim sua capacidade de translocação. Em segundo lugar, a barreira epitelial do trato gastrointestinal por si só representa um obstáculo significativo contra a translocação microbiana. Caso os produtos microbianos atravessem o muco e a barreira epitelial, eles são recebidos por um grande número de macrófagos especializados, residentes do trato gastrointestinal, que impedem que tais produtos acessem a circulação sistêmica (BRENCHLEY; DOUEK, 2012).

No entanto, caso os macrófagos do trato gastrointestinal não contenham os produtos microbianos, eles são drenados pela veia porta para o fígado; assim, uma das muitas funções desempenhadas pelo fígado é a depuração de substâncias estranhas e potencialmente prejudiciais que drenam do trato gastrointestinal. Portanto, para acessar a circulação sistêmica, os antígenos microbianos que se originam no trato gastrointestinal devem passar por meio do muco luminal e IgA, atravessar a barreira epitelial fechada, escapar da captação pelos macrófagos da lâmina própria do trato gastrointestinal e evitar a depuração hepática (BRENCHLEY; DOUEK, 2012).

Uma vez na circulação, a presença de lipopolissacarídeo (LPS) promove a síntese hepática da proteína de ligação de lipopolissacarídeo (LBP, do inglês *LPS-binding protein*) responsável pelo aumento da ligação desse componente bacteriano ao coreceptor CD14, adjacente ao receptor *Toll like 4* (TLR-4), expressos na superfície de monócitos. Quando ocorre a ligação dos LPS ao coreceptor CD14, estas células sanguíneas secretam CD14 solúvel (sCD14) na circulação (PŁÓCIENNIKOWSKA et al., 2015).

Em seguida à ativação dos receptores TLR-4 pela ligação dos componentes microbianos, as células do sistema imune acionam uma cascata de sinalização, levando à produção de citocinas pró-inflamatórias (i.e. interleucina-1 β , interleucina-6, fator de necrose tumoral e interferons tipo I) (MENG; LOWELL, 1997; SANDLER et al., 2011b; ZANONI; GRANUCCI, 2013) que podem induzir condições inflamatórias crônicas, como o desenvolvimento da aterosclerose (PŁÓCIENNIKOWSKA et al., 2015).

Além da defesa local contra a translocação microbiana, no nível da mucosa gastrintestinal e pelo fígado, várias linhas de proteção são ativadas na circulação sistêmica para neutralizar a translocação do LPS e seus efeitos como uma potente molécula de ativação imunológica (MARCHETTI; TINCATI; SILVESTRI, 2013). Esses fatores de proteção incluem IgM, IgG e IgA específicos para o antígeno central do LPS, denominados anticorpos do núcleo

da endotoxina (EndoCAb, do inglês *Endotoxin core antibody*). Em condições clínicas com grande quantidade de endotoxinas circulantes resultam no consumo de EndoCAb para neutralizar os LPS (MARCHETTI; TINCATI; SILVESTRI, 2013).

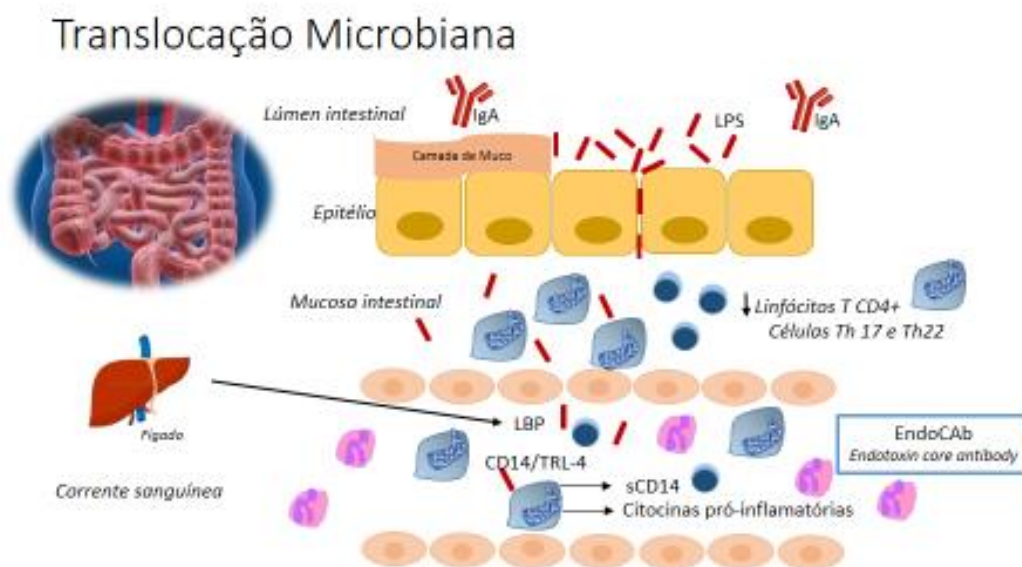


Figura 1 – Esquema dos mecanismos envolvidos na translocação microbiana
Fonte: A autora.

Evidências sugerem que a translocação microbiana é um fator preditor da progressão da doença pelo HIV, da restauração imunológica deficiente e de morbidade não relacionada à AIDS (do inglês, *acquired immunodeficiency syndrome* ou síndrome da imunodeficiência adquirida), como as DCV (TRØSEID et al., 2014). Portanto, o risco do desenvolvimento de DCV na infecção pelo HIV tem sido associado à translocação microbiana persistente e ao mesmo tempo à baixa contagem de células CD4+ (apesar da eficácia da TARV) (TRØSEID et al., 2014). Desta forma, translocação microbiana persistente em indivíduos infectados pelo HIV em TARV desempenha um papel importante na patogênese da imunodeficiência induzida pelo HIV, pois níveis mais elevados de translocação microbiana estão associados à ativação sistêmica de células T e à recuperação deficiente de células T CD4+ (JIANG et al., 2009).

1.3 BIOMARCADORES DE TRANSLOCAÇÃO MICROBIANA

A translocação microbiana pode ser avaliada no plasma pela quantificação direta de produtos bacterianos, tais como LPS (componentes da parede celular de bactérias *gram* negativas), peptidoglicanos (componentes da parede celular de bactérias *gram* positivas) ou fragmentos de DNA ribossomal bacteriano (rDNA) (LICHTFUSS et al., 2011). Ao mesmo tempo, a translocação microbiana pode ser avaliada de forma indireta pela avaliação de LBP, sCD14 ou EndoCAB (LICHTFUSS et al., 2011).

O método mais frequentemente utilizado para quantificar o LPS no plasma é o Lisado de Amebócito do *Limulus* (LAL), que utiliza uma série de reações enzimáticas que imitam a cascata de coagulação (ABATE et al., 2017). Esse método de detecção de endotoxinas foi desenvolvido a partir das observações do pesquisador Bang, que demonstrou uma coagulação intravascular fatal em caranguejos ferradura (*Limulus polyphemus*) provocada pela infecção por bactérias *gram* negativas (BANG, 1956). O LAL foi introduzido na medicina clínica por Levin e Bang, primeiro eles demonstraram que essa coagulação era causada por uma reação entre a endotoxina e uma proteína coagulável encontrada nos amebócitos circulantes do caranguejo ferradura (LEVIN; BANG, 1964). Posteriormente, Levin e Bang desenvolveram anticoagulantes apropriados para hemolinfa do caranguejo ferradura e prepararam um lisado de amebócitos lavados, que se apresentou como indicador altamente sensível para presença de endotoxina (LEVIN; BANG, 1968). Mais tarde, a proteína coagulável do LAL foi caracterizada e purificada, apresentando com a endotoxina uma reação do tipo enzimática (SOLUM, 1970, 1973; YOUNG; LEVIN; PRENDERGAST, 1972).

Porém, esse ensaio apresenta alta sensibilidade e a contaminação durante a preparação da amostra e/ou na realização do teste podem ocorrer facilmente (LICHTFUSS et al., 2011). Além disso, as reações enzimáticas dependem criticamente do tempo e da temperatura, e podem ser afetadas por inúmeros inibidores presentes no plasma (LICHTFUSS et al., 2011). Ao mesmo tempo, a heterogeneidade na estrutura, solubilidade, estado físico e bioatividade do LPS colocam limitações importantes na interpretação dos testes de endotoxina plasmática (MUNFORD, 2016).

Ainda, deve ser lembrado que é normal um aumento plasmático de LPS em indivíduos saudáveis após uma refeição rica em gordura, provavelmente devido ao co-transporte sobre a parede intestinal com a gordura da dieta, por incorporação em quilomícrons ricos em triglicérides (TRØSEID et al., 2014).

Outro método direto para detectar a translocação microbiana é pesquisa do ácido desoxirribonucleico ribossomal (rDNA) bacteriano, quantificado no plasma, utilizando técnicas de amplificação baseadas em PCR (do inglês, *Polymerase Chain Reaction* ou Reação em Cadeia da Polimerase), que permite a identificação de diferentes espécies bacterianas (MARCHETTI; TINCATI; SILVESTRI, 2013). No entanto, a contaminação por DNA exógeno durante o fluxo de trabalho ou a presença de traços de DNA em reagentes de PCR, incluindo Taq DNA polimerase da cepa de produção, podem ser responsáveis por resultados falso-positivos (MARCHETTI; TINCATI; SILVESTRI, 2013).

Os biomarcadores indiretos sCD14, LBP e EndoCAb são quantificados no plasma ou soro por ELISA (do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* ou Ensaio de Imunoabsorção Enzimática), que na maioria das vezes produzem resultados confiáveis e reprodutíveis (MARCHETTI; TINCATI; SILVESTRI, 2013). Segundo Lichtfuss (2011), a quantificação de sCD14 é altamente reprodutível e pode ser usado de forma confiável, ao contrário do LPS que apresenta limitações metodológicas importantes (LICHTFUSS et al., 2011). Porém, deve ser destacado que o sCD14 é um biomarcador de ativação de monócitos, não restrito a ativação por LPS. Embora o LPS seja um potente ativador de monócitos que se liga ao CD14 e induza a liberação celular de sCD14, outros ligantes TLR como flagelina e oligodesoxinucleotídeos CpG também podem induzir a liberação de sCD14 (SHIVE et al., 2015).

Além disso, deve ser levado em consideração que a infecção aguda pelo HIV está associada a níveis relativamente normais de LPS, com níveis aumentados de LBP, sCD14 e EndoCAb quando comparado aos níveis plasmáticos de indivíduos não infectados, sugerindo que a translocação contínua de LPS é rapidamente neutralizada pela resposta do hospedeiro (MARCHETTI; TINCATI; SILVESTRI, 2013). No entanto, os títulos de EndoCAb diminuem progressivamente à medida que a infecção pelo HIV entra em sua fase crônica, que se torna caracterizada por níveis plasmáticos mais elevados de LPS (MARCHETTI; TINCATI; SILVESTRI, 2013). Embora os biomarcadores de translocação microbiana e ativação de monócitos diminuam durante a TARV supressiva, eles permanecem persistentemente anormais em comparação com indivíduos não infectados pelo HIV, mesmo após vários anos de supressão viral (JIANG et al., 2009).

É importante ressaltar que vários estudos sugerem que os biomarcadores plasmáticos de translocação microbiana e ativação de monócitos, LPS, LBP e sCD14 estão relacionados a fatores tradicionais de risco cardiometabólicos como: hipertensão, dislipidemia, resistência à insulina e a progressão da aterosclerose subclínica em indivíduos infectados pelo HIV (KELESIDIS et al., 2012; MANNER et al., 2013; PEDERSEN et al., 2013; TIMMONS et al.,

2014). A elevação dos níveis plasmáticos de LPS nos primeiros anos da infecção crônica pelo HIV é um forte indicador da progressão dessa patologia (MARCHETTI et al., 2011). Os níveis de sCD14 auxiliam, de forma independente, a prever a mortalidade na infecção pelo HIV (ROMERO-SÁNCHEZ et al., 2012; SANDLER et al., 2011). Evidências demonstram que os níveis de sCD14 desempenham papel significativo no desenvolvimento da aterosclerose entre indivíduos infectados pelo HIV (HANNA et al., 2017). Consequentemente, os níveis de LPS, LBP e sCD14 no sangue periférico podem ser utilizados na monitorização e avaliação laboratorial da infecção pelo HIV (ROMERO-SÁNCHEZ et al., 2012).

1.4 BIOMARCADORES DE INFLAMAÇÃO E RISCO CARDIOVASCULAR

A inflamação é uma característica marcante da infecção pelo HIV e um elemento-chave na patogênese das DCV (BAKER; DUPREZ, 2010). Os biomarcadores cardiovasculares têm o potencial de aumentar a estratificação do risco clínico, auxiliando na triagem, diagnóstico e avaliação do prognóstico (MAY; WANG, 2008). Portanto, os biomarcadores são, atualmente, foco de interesse imenso na prática clínica, não só por auxiliarem no diagnóstico e no acompanhamento, mas também por facilitarem a compreensão da fisiopatologia do processo da doença (CHACKO et al., 2018). Desta forma, torna-se importante a identificação de biomarcadores adicionais a partir de novas vias biológicas (MAY; WANG, 2008).

Diversas linhas de evidências demonstram a interligação entre a mieloperoxidase (MPO; EC 1.11.1.7), a inflamação e o processo aterogênico (TENG et al., 2017). Pesquisas recentes têm focado em novos marcadores inflamatórios dos quais a MPO, liberada de forma sistêmica e local por leucócitos ativados, tem se mostrado bastante promissora (TENG et al., 2017).

A MPO é uma enzima encontrada predominantemente em neutrófilos e monócitos, que exerce efeitos em etapas importantes do processo aterosclerótico: participa da disfunção endotelial, modificações oxidativas das lipoproteínas de baixa e alta densidade (LDL-C e HDL-C), instabilização e ruptura da placa aterosclerótica (NICHOLLS; HAZEN, 2009). Desta forma, a MPO tem sido evidenciada como um valioso biomarcador de risco cardiovascular na população geral (BALDUS et al., 2003; MEUWESE et al., 2007; ZHANG et al., 2001) e em infectados pelo HIV (ROSS et al., 2009).

A primeira publicação que demonstrou a associação entre MPO e DCV foi um estudo caso-controle, com 158 indivíduos com doença arterial coronariana estabelecida e 175 controles, desenvolvido por Zhang et al. (2001), no qual a atividade de MPO foi

significativamente maior para os casos de doença do que para os controles (ZHANG et al., 2001). Baldus et al. (2003) avaliaram 1.090 pacientes com síndromes coronarianas agudas, durante 6 meses de acompanhamento e demonstraram que os níveis séricos de MPO podem prever um risco aumentado para eventos cardiovasculares subsequentes e ampliar as informações prognósticas obtidas dos marcadores bioquímicos tradicionais (BALDUS et al., 2003). Meuwese et al. (2007) demonstraram a associação entre MPO e DCV, avaliando 1.138 indivíduos com doença arterial coronariana estabelecida e 2.237 controles, sendo que o quartil superior da MPO versus o quartil inferior estava relacionado para doença arterial coronariana após ajuste para fatores de risco tradicionais (MEUWESE et al., 2007).

No estudo desenvolvido por Scharnagl et al. (2014) com 3.036 participantes, durante um tempo médio de 7,75 anos, foi observado que as concentrações de MPO estão independentemente associadas ao risco de mortalidade geral e cardiovascular em pacientes com doença arterial coronariana (SCHARNAGL et al., 2014). Kacprzak e Zielinska (2016) demonstraram que a MPO é um marcador prognóstico em pacientes com infarto agudo do miocárdio com supradesnívelamento do segmento ST tratados com intervenção coronária percutânea primária (KACPRZAK; ZIELINSKA, 2016). Em 2018, Mayyas et al. demonstraram que altos níveis plasmáticos de MPO estão associados a um risco aumentado de doença cardiovascular aterosclerótica (MAYYAS et al., 2018). Ross et al. (2009) verificaram a associação entre as concentrações de MPO plasmáticas e a espessura das camadas íntima e média da artéria carótida em indivíduos infectados pelo HIV (ROSS et al., 2009).

Todos os estudos mencionados acima relataram associações significativas entre MPO e DCV. Em contraste, um estudo caso-controle com indivíduos infectados pelo HIV não mostrou associação significativa independente da MPO com eventos cardiovasculares (EL-BEJJANI et al., 2008). Porém, deve ser ressaltado que esse estudo determinou os níveis de MPO em plasmas armazenados nos 6-12 meses que precederam os eventos cardiovasculares (EL-BEJJANI et al., 2008). Em outro estudo, com pacientes submetidos a angiografia coronariana eletiva, não foram observadas diferenças significativas nas concentrações de MPO dos indivíduos com doença arterial coronariana estável em comparação com aqueles sem comprovação, sugerindo que a liberação sistêmica de MPO não é uma característica da doença arterial coronariana assintomática (KUBALA et al., 2008). Uma possível explicação para esses resultados pode ser o menor risco da doença arterial coronariana estável versus a instável (SCHINDHELM et al., 2009). Pois, eventos cardiovasculares são mais prováveis em DCV instáveis, tais observações podem indicar que a MPO é um biomarcador particularmente útil em populações de alto risco (SCHINDHELM et al., 2009).

A maioria dos estudos que investigam o papel da MPO nas doenças cardiovasculares, quantificaram o conteúdo protéico da enzima no plasma/soro ou nos leucócitos circulantes, sendo que o método mais frequentemente utilizado para dosar a concentração de MPO é o ELISA (TENG et al., 2017). Fatores que podem afetar as medições da MPO por ELISA incluem o processamento, o armazenamento e o anticoagulante usado (TENG et al., 2017), sendo que: **i)** a concentração plasmática de MPO aumenta com o tempo que o sangue total é mantido à temperatura ambiente antes da centrifugação para obtenção do plasma (TENG et al., 2017); **ii)** amostras coletadas em tubos de EDTA armazenados no gelo ou em temperatura ambiente e amostras coletadas em tubo sem anticoagulante que permanecem em temperatura ambiente por aproximadamente 1 hora antes da centrifugação para obtenção de plasma e soro, com posterior armazenamento a -80° C, apresentam maior estabilidade (KARAKAS; KOENIG, 2012) e **iii)** existem diferenças com relação ao tipo de amostra utilizada, o soro e o plasma obtido a partir de heparina contêm mais proteína MPO do que o plasma obtido a partir do EDTA (Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético) ou tubos com citrato, possivelmente devido à "liberação" *ex vivo* de MPO das células sanguíneas (KARAKAS; KOENIG, 2012).

Outro biomarcador, a PCR (Proteína C Reativa) plasmática, determinada por ensaios altamente sensíveis (PCR-us, Proteína C Reativa-ultra sensível), é o biomarcador inflamatório de fase aguda não específico mais estudado e utilizado na prática clínica como preditor independente de risco cardiovascular, conforme demonstrado por vários estudos de coorte envolvendo a população geral (KOENIG et al., 2004; RIDKER et al., 2000, 2002) ou indivíduos infectados pelo HIV (TRIAINT; MEIGS; GRINSPOON, 2009).

Os indivíduos infectados pelo HIV permanecem com alto risco de morbidades não associadas à AIDS (HUNT, 2010). A inflamação persistente, apesar da TARV supressiva, emergiu como um potencial mediador chave desse risco, e a translocação microbiana parece ser um dos principais fatores determinantes desse estado inflamatório persistente (HUNT, 2010). A identificação de indivíduos com risco para o desenvolvimento de DCV utilizando os biomarcadores apresenta-se como uma importante ferramenta auxiliar na monitorização e no tratamento precoce de indivíduos infectados pelo HIV (WORM; HSUE, 2010).

2. JUSTIFICATIVA

Com base nas informações expostas anteriormente, verifica-se que muitos fatores estão envolvidos na estimulação do sistema imune e na presença de inflamação sistêmica na infecção pelo HIV, podendo contribuir para fisiopatologia das doenças cardiovasculares. Evidências sugerem que a translocação microbiana é um fator preditor da progressão da doença, da restauração imunológica deficiente e de morbidade não relacionada à AIDS, como as DCV (TRØSEID et al., 2014).

Os biomarcadores são atualmente o foco de interesse imenso na prática clínica, não só por auxiliarem no diagnóstico e no acompanhamento, mas também por facilitarem a compreensão da fisiopatologia do processo da doença (CHACKO et al., 2018). Além disso, a elevada prevalência da doença cardiovascular subclínica em indivíduos infectados pelo HIV (KELESIDIS et al., 2012) reforça a importância de pesquisas voltadas para o diagnóstico precoce no laboratório clínico.

Uma ampla variedade de biomarcadores de translocação microbiana, inflamação e risco cardiovascular, em indivíduos infectados pelo HIV, foi previamente avaliada em trabalhos anteriores (KELESIDIS et al., 2012; REUS BANULS et al., 2014; TIMMONS et al., 2014). Porém, torna-se importante avaliar as possíveis relações entre esses biomarcadores na avaliação clínico-laboratorial. No entanto, para o nosso conhecimento nenhum estudo pesquisou a MPO com relação aos biomarcadores de translocação microbiana em adultos infectados pelo HIV ou investigou as possíveis relações entre os biomarcadores solúveis (isto é, biomarcadores que podem ser avaliados no plasma ou soro) de translocação microbiana, inflamação e risco cardiovascular em um único trabalho.

Portanto, espera-se demonstrar a importância de biomarcadores que sejam capazes de detectar grupos expostos a maior risco, permitindo ação precoce na tentativa de minimizar as complicações e permitir melhor qualidade de vida para as pessoas infectadas pelo HIV. Desta forma, o maior impacto desta pesquisa será contribuir para o conhecimento das relações entre os biomarcadores de translocação microbiana, inflamação e risco cardiovascular; levando em consideração, o potencial risco do desenvolvimento de doenças cardiovasculares, o estado imunológico, o esquema terapêutico utilizado e o tempo de infecção dos indivíduos infectados pelo HIV.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar as possíveis relações entre os biomarcadores de translocação microbiana, inflamação e risco cardiovascular em indivíduos infectados pelo HIV.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i) Realizar uma revisão sistemática:
 - Identificar os principais os biomarcadores solúveis de translocação microbiana, inflamação e risco cardiovascular mais utilizados na literatura;
 - Avaliar as possíveis associações entre esses biomarcadores em indivíduos infectados pelo HIV.
- ii) Proceder uma pesquisa quantitativa:
 - Caracterizar os voluntários da pesquisa quanto ao sexo, idade, tempo de infecção, contagem de células T CD4+, T CD8+, carga viral, tempo de tratamento e esquema terapêutico utilizado;
 - Classificar os indivíduos infectados pelo HIV de acordo com os níveis plasmáticos de PCR-us e MPO para potencial aumento de risco do desenvolvimento de doenças cardiovasculares;
 - Categorizar os indivíduos infectados pelo HIV de acordo com o estado imunológico, por meio da contagem absoluta de células T CD4+;
 - Relacionar os indivíduos infectados pelo HIV de acordo com o esquema terapêutico utilizado;
 - Diferenciar os participantes da pesquisa de acordo com o tempo de infecção pelo HIV;
 - Comparar as possíveis alterações nos biomarcadores em diferentes situações como: potencial risco do desenvolvimento de doenças cardiovasculares, estado imunológico, esquema terapêutico utilizado e tempo de infecção dos indivíduos infectados pelo HIV;
 - Correlacionar os níveis plasmáticos dos biomarcadores de translocação microbiana, inflamação e risco cardiovascular avaliados no estudo.

4. DESENVOLVIMENTO

4.1 DELINEAMENTO DA PESQUISA

Esta pesquisa foi dividida em duas etapas. Na primeira etapa foi realizado uma revisão sistemática, com finalidade de: **i)** sintetizar a evidência disponível na literatura sobre os biomarcadores solúveis de translocação microbiana, inflamação e risco cardiovascular mais utilizados e **ii)** avaliar as possíveis associações entre eles em indivíduos infectados pelo HIV. Com base nos resultados da revisão sistemática foi desenvolvida a estratégia de pesquisa para segunda etapa dessa tese de doutorado.

Na segunda etapa foi realizado um estudo quantitativo com coleta de sangue venoso e análises laboratoriais dos indivíduos infectados pelo HIV, atendidos no Laboratório Municipal Alfredo Berger, referência macrorregional, para a 3^a, 4^a, 5^a, 7^a, 8^a e 21^a regionais de saúde do Paraná, no Município de Ponta Grossa. Essa etapa do trabalho apresentou como critério analisar e avaliar os biomarcadores plasmáticos em indivíduos infectados pelo HIV em diferentes situações: **i)** potencial aumento do risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, de acordo com os níveis plasmáticos de PCR-us e MPO; **ii)** estado imunológico, detectado pelos níveis plasmáticos de células T CD4+; **iii)** esquema terapêutico utilizado e **iv)** tempo de infecção pelo HIV.

Desta forma, a descrição detalhada dos materiais e métodos, os resultados obtidos, assim como a discussão sobre as informações geradas, está apresentada conforme os dados adquiridos a partir de cada etapa desta pesquisa.

4.2 PRIMEIRA ETAPA: REVISÃO SISTEMÁTICA

4.2.1 Materiais e métodos

4.2.1.1 Revisão sistemática da literatura

Esta revisão sistemática foi realizada de acordo orientações propostas no *check list Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (PRISMA) (LIBERATI et al., 2009). A realização do levantamento bibliográfico sistemático foi realizada nas bases de dados eletrônicas, incluindo *Medline*, *Scopus* e *Web of Science*, para identificar possíveis estudos que examinaram a relação entre biomarcadores de translocação microbiana, inflamação e risco cardiovascular em indivíduos infectados pelo HIV. Os termos utilizados para a pesquisa na literatura foram: (HIV OR Human Immunodeficiency Virus OR AIDS) AND (Microbial

Translocation) AND (Cardiovascular Diseases), limitados ao título e ao resumo. As bases de dados foram pesquisadas para estudos publicados até dezembro de 2017, sem limite inicial da data de publicação.

4.2.1.2 Seleção dos estudos

Primeiro, os estudos foram selecionados com base no título e resumo, sendo utilizados os seguintes critérios de inclusão: i) estudos caso-controle, coorte transversais, coorte longitudinais e ensaios clínicos; ii) estudos que determinaram biomarcadores solúveis para: translocação microbiana, inflamação e risco cardiovascular (isto é, biomarcadores que podem ser avaliados no plasma ou soro). Foram excluídos: i) estudos de revisão; ii) estudos com indivíduos infectados pelo HIV com idade inferior a 18 anos; iii) estudos em animais e iv) estudos *in vitro*. Em segundo lugar, foram avaliados artigos com texto completo, sendo utilizado como critério de exclusão: nenhuma relação descrita entre os biomarcadores solúveis de translocação microbiana, inflamação e risco cardiovascular (Figura 2).

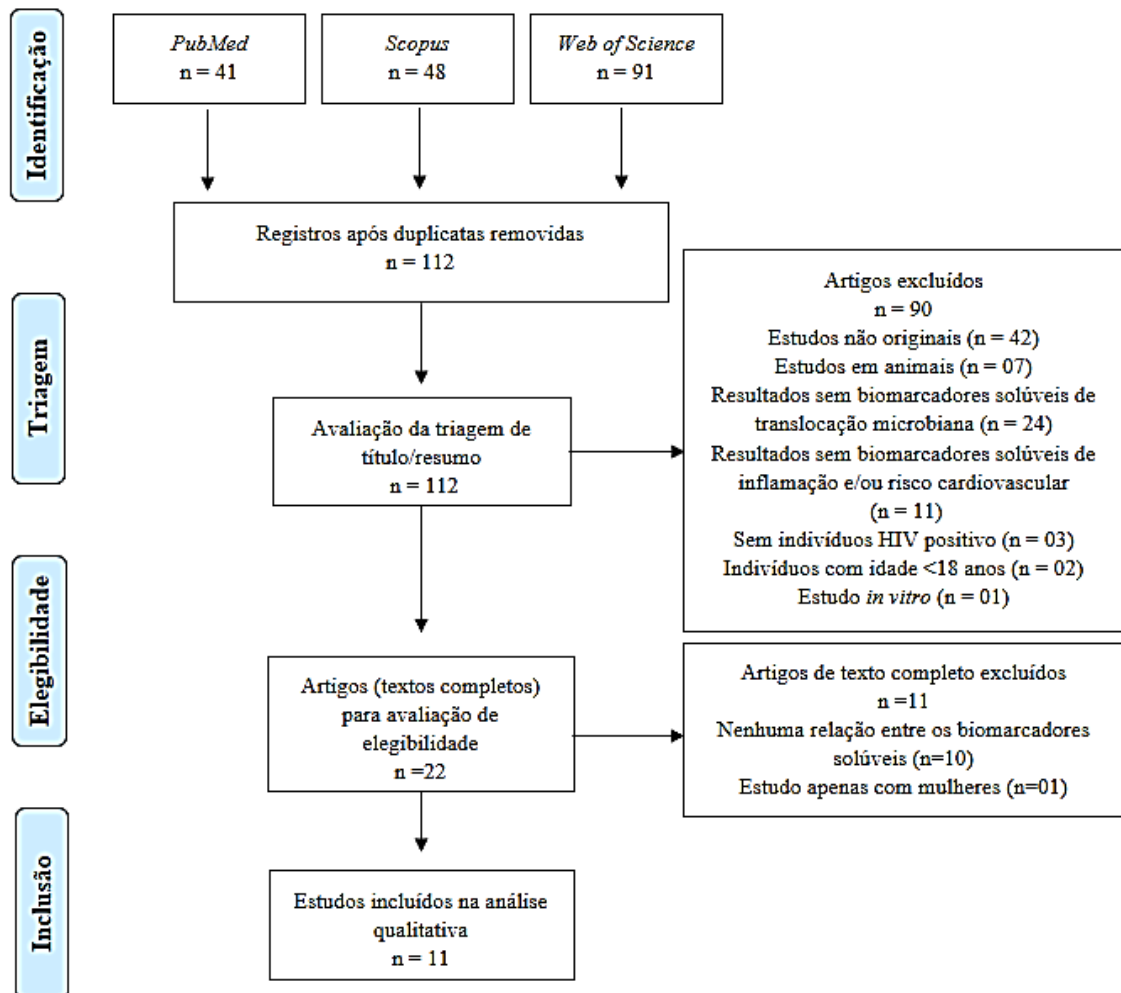


Figura 2 - Fluxograma da seleção dos estudos

Fonte: A autora

4.2.1.3 Extração de dados

Usando um formulário de extração de dados padronizado (ANEXO A), os seguintes dados foram extraídos dos artigos de texto completo recuperados: país, ano de publicação, desenho do estudo, tamanho da amostra, sexo, idade, contagem de células T CD4+, percentagem de participantes em TARV, biomarcadores solúveis de translocação microbiana, de inflamação e de risco cardiovascular avaliados, métodos laboratoriais para os biomarcadores e as possíveis associações entre os biomarcadores.

4.2.1.4 Análise crítica dos estudos incluídos

Os artigos selecionados foram avaliados de acordo com os níveis de evidência científica segundo a Classificação de *Oxford Centre for Evidence-Based Medicine* (Figura 3) (PHILLIPS et al., 2009). Dois pesquisadores (BORATO, DCK e VELLOSSA, JCR) realizaram todas as etapas da pesquisa de forma independente; as discrepâncias foram discutidas em uma reunião de consenso entre os dois revisores.

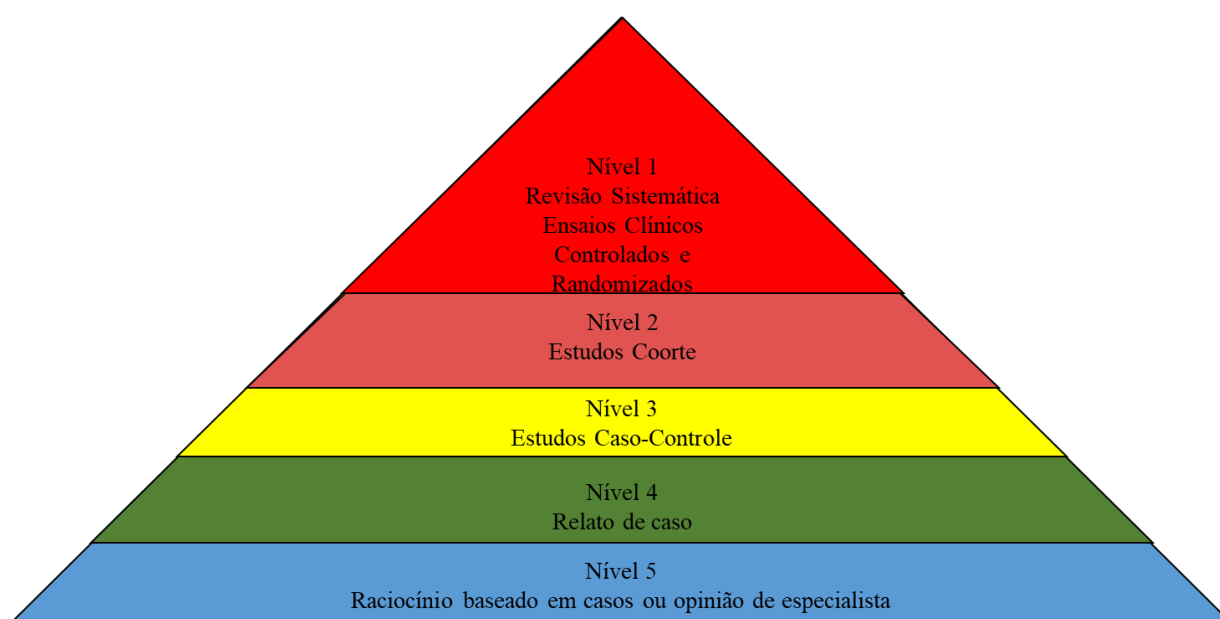


Figura 3 - Níveis de evidência científica

Fonte: Baseado no CEBM (*Centre for Evidence-Based Medicine*). *Oxford Centre for Evidence-based Medicine - Levels of Evidence*, 2009.

4.2.1.5 Análise dos resultados

Devido a heterogeneidade dos estudos, principalmente com relação a avaliação dos biomarcadores em grupos e subgrupos diferentes de indivíduos infectados pelo HIV, os resultados foram apresentados de maneira descritiva, utilizando média $\pm$ desvio-padrão, número e percentual.

As avaliações das possíveis associações entre os biomarcadores foram divididas em grupos de acordo com cada biomarcador de translocação microbiana identificado nos estudos. A extração dos resultados de associação entre os biomarcadores foi realizada na seguinte ordem: **i)** análise de regressão linear múltipla; **ii)** análise de regressão linear simples e **iii)** correlação; caso nenhuma destas relações estivessem relatadas foram extraídos dados da

associação entre a presença de translocação microbiana e alterações dos biomarcadores de inflamação e risco cardiovascular.

O resultado foi relatado como: associação positiva, associação inversa, sem associação ou sem dados (avaliando os biomarcadores de forma isolada, o estudo não relatou associação com algum dos biomarcadores analisados). Nos resultados do presente estudo, tanto a dosagem regular da PCR quanto a determinada por ensaios altamente sensíveis (PCR-us), foram relatadas como PCR.

4.2.2 Resultados e Discussão

A pesquisa da literatura resultou em 180 artigos, sendo selecionado para leitura de texto completo 22 artigos e apenas 11 foram elegíveis para extração dos dados (Figura 2). A caracterização dos estudos selecionados está descrita na Tabela 1. Os resultados demonstraram que a maioria dos estudos analisados (45,5%) foi realizado nos Estados Unidos da América (KELESIDIS et al., 2012; SANDLER et al., 2011, 2014; STEELE et al., 2014; TIMMONS et al., 2014). Três estudos (27,3%) foram realizados na Dinamarca (HAISSMAN et al., 2017; PEDERSEN et al., 2013, 2014), dois (18,2%) na Espanha (LEÓN et al., 2017; REUS BAÑULS et al., 2014) e um (9,1%) na Holanda (VAN DEN DRIES et al., 2015). Todos os estudos foram publicados entre 2011 e 2017.

O delineamento de estudo coorte transversal foi o mais utilizado (54,6%) (HAISSMAN et al., 2017; PEDERSEN et al., 2013, 2014; REUS BAÑULS et al., 2014; STEELE et al., 2014; TIMMONS et al., 2014), seguido pelo coorte longitudinal (KELESIDIS et al., 2012; VAN DEN DRIES et al., 2015) e caso-controle (LEÓN et al., 2017; SANDLER et al., 2011) (18,2% cada), e apenas um estudo clínico (9,1%) (SANDLER et al., 2014) (Tabela 1). Portanto, a maioria dos estudos (73%) foi classificada com nível 2 de evidência científica (HAISSMAN et al., 2017; KELESIDIS et al., 2012; PEDERSEN et al., 2013, 2014; REUS BAÑULS et al., 2014; STEELE et al., 2014; TIMMONS et al., 2014; VAN DEN DRIES et al., 2015), de acordo com Classificação de *Oxford Centre for Evidence-Based Medicine* (Tabela 1).

Um total de 1.769 indivíduos infectados pelo HIV foram incluídos no estudo. As características demográficas (sexo e idade), os dados clínicos da infecção pelo HIV (contagem de células T CD4⁺ e uso de antirretrovirais) e as informações dos biomarcadores de translocação microbiana, inflamação e risco cardiovascular estão descritos na Tabela 2.

A maioria dos estudos apresentou prevalência do sexo masculino, com mais de 50% da população constituída por homens, com idade média de $46,50 \pm 4,70$ anos (Tabela 2). Com relação aos dados clínicos da infecção pelo HIV, a contagem média de células T CD4⁺ foi de 532 ± 107 células/mm³ e o uso de TARV foi observada em 10 (90,9%) estudos (HAISSMAN et al., 2017; KELESIDIS et al., 2012; LEÓN et al., 2017; PEDERSEN et al., 2013, 2014; REUS BAÑULS et al., 2014; SANDLER et al., 2011; STEELE et al., 2014; TIMMONS et al., 2014; VAN DEN DRIES et al., 2015) (Tabela 2).

Tabela 1 - Caracterização dos artigos selecionados para análise

Autor	Titulo	País/Ano de publicação	Delineamento do estudo	Nível de Evidência
Haissman, et al.	<i>Microbiota-dependent metabolite and cardiovascular disease marker trimethylamine-N-oxide (TMAO) is associated with monocyte activation but not platelet function in untreated HIV infection</i>	Dinamarca 2017	Coorte transversal	Nível 2
Kelesidis, et al.	<i>Biomarkers of Microbial Translocation and Macrophage Activation: Association With Progression of Subclinical Atherosclerosis in HIV-1 Infection</i>	EUA 2012	Coorte longitudinal	Nível 2
León, et al.	<i>Subclinical atherosclerosis in low Framingham risk HIV Patients</i>	Espanha 2017	Caso-controle	Nível 3
Pedersen, et al.	<i>Microbial Translocation in HIV Infection Is Associated With Dyslipidemia, Insulin Resistance, and Risk of Myocardial Infarction</i>	Dinamarca 2013	Coorte transversal	Nível 2
Pedersen, et al.	<i>Monocyte Activation, but not Microbial Translocation, Is Independently Associated With Markers of Endovascular Dysfunction in HIV-Infected Patients Receiving cART</i>	Dinamarca 2014	Coorte transversal	Nível 2
Reus Bañuls, et al.	<i>Asociación entre marcadores inflamatorios y traslocación bacteriana en pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana en tratamiento antirretroviral</i>	Espanha 2014	Coorte transversal	Nível 2
Sandler, et al.	<i>Plasma Levels of Soluble CD14 Independently Predict Mortality in HIV Infection</i>	EUA 2011	Caso-controle (Controles pareados)	Nível 3
Sandler, et al.	<i>Sevelamer Does Not Decrease Lipopolysaccharide or Soluble CD14 Levels But Decreases Soluble Tissue Factor, Low-Density Lipoprotein (LDL) Cholesterol, and Oxidized LDL Cholesterol Levels in Individuals With Untreated HIV Infection</i>	EUA 2014	Clínico	Nível 1
Steele, et al.	<i>Contribution of Intestinal Barrier Damage, Microbial Translocation and HIV-1 Infection Status to the Inflammatory Signature</i>	EUA 2014	Coorte transversal	Nível 2
Timmons, et al.	<i>Microbial Translocation and Metabolic and Body Composition Measures in Treated and Untreated HIV Infection</i>	EUA 2014	Coorte transversal	Nível 2
van den Dries, et al.	<i>von Willebrand Factor is elevated in HIV patients with a history of thrombosis</i>	Holanda 2015	Coorte longitudinal	Nível 2

Fonte: A autora

Tabela 2 - Caracterização dos indivíduos infectados pelo HIV e biomarcadores de translocação microbiana, inflamação e risco cardiovascular

Autor/Ano	Grupos do Estudo	Sexo ♂ (%)	Idade	CD4+ (células/mm ³)	TARV (%)	Biomarcadores de translocação microbiana, inflamação e risco cardiovascular	Métodos
van den Dries, et al./2015	65 com trombose 65 sem trombose	83 83	56 ± 11 54 ± 11	Não relatado Não relatado	97% 95%	LPS, LBP, sCD14 e FvW	Cromogênico Cinético: LPS; ELISA: LBP, sCD14 e FvW
Haissman, et al./2017	50 sem TARV 50 com TARV	45 43	41 (33 - 46) 43 (36 - 48)	560 (415-795) 610 (480-875)	50%	LPS, sCD14, PCR e TMAO	Lisado de amebócitos de Limulus: LPS; ELISA: sCD14 e PCR; Espectrometria de massa: TMAO
Kelesidis, et al./2012	29 com IP 26 sem IP	97 92	41 (38 - 45) 41 (36 - 47)	535 (369-707) 477 (334-674)	100%	LPS, sCD14, PCR-us, Homocisteína, perfil lipídico	Lisado de amebócitos de Limulus: LPS; ELISA: sCD14; Não relatado: PCR-us, Homocisteína, perfil lipídico
León, et al./2017	18 com Aterosclerose subclínica 66 sem Aterosclerose subclínica	90 71	42 ± 7 42 ± 7	657 ± 217	100%	rDNA, sCD14, IL-6, TNF- α	Amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR): rDNA; ELISA: sCD14, IL-6, TNF- α
Pedersen, et al./2013	60	90	47 (40 - 65)	581 (516-646)	100%	LPS, perfil lipídico	Lisado de amebócitos de Limulus: LPS; Não relatado: perfil lipídico
Pedersen, et al./2014	60	90	47 (40 - 65)	581 (516-646)	100%	LPS, sCD14, ADMA e seu estereoisômero SDMA, D-dímero e PCR-us	Lisado de amebócitos de Limulus: LPS; ELISA: sCD14; HPLC: ADMA e SDMA; fotometria: D-dímero e PCR-us
Reus Bañuls, et al./2014	27 IL-6 ou TNF- α > percentil 75 54 IL-6 ou TNF- α < percentil 75	74 72	47 (41 - 2) 44 (40 - 49)	430 (387-552) 566 (300-855)	100%	rDNA, sCD14, IL-6, TNF- α , perfil lipídico	Amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR): rDNA; ELISA: sCD14, IL-6, TNF- α ; Não relatado: perfil lipídico
Sandler, et al./2011	74 Indivíduos que morreram 148 Controles HIV + 120 com DCV 238 Controles HIV + 81 com AIDS HIV + 162 Controles HIV +	78,4 78,4 80,8 80,7 71,6 71,6	50 (42 - 55) 48 (43 - 55) 49 (44 - 56) 48 (42 - 55) 46 (40 - 53) 45 (39 - 52)	551 (410-713) 619 (476-838) 607 (463-841) 638 (496-816) 588 (465-729) 577 (488-764)	78,4% 82,4% 85,8% 86,1% 72,8% 79,7%	LPS, rDNA, sCD14, EndoCAb, I-FABP, IL-6, amiloide sérica A, PCR-us, D-dímero	Lisado de amebócitos de Limulus: LPS; Amplificação por PCR: rDNA; ELISA: sCD14, EndoCAb e I-FABP; Não relatado: IL-6, amiloide sérica A, PCR-us, D-dímero
Sandler, et al./2014	36	72	44 (35 - 51)	585 (494-716)	0%	LPS, LBP, sCD14, EndoCAb, IL-6, PCR, IP-10, IL-1 β , sCD163, fetuina-A, sFT, D-dímero, oxLDL	Lisado de amebócitos de Limulus: LPS; ELISA: LBP, sCD14, EndoCAb, IL-6, PCR, IP-10, IL-1 β , sCD163, fetuina-A, sFT, D-dímero, oxLDL
Steele, et al./2014	83	83	56 (24 - 81)	595 (130-1400)	78%	LPS, sCD14s, IL-6, iFABP, PCR-us	Lisado de amebócitos de Limulus: LPS; ELISA: sCD14, IL-6, iFABP e PCR-us
Timmons, et al./2014	82 do ACTG 79 do ACTG 24 semanas após TARV 49 do UI com TARV 47 UI sem TARV	92 92 65 81	35,6 ± 8,3 35,6 ± 8,3 40,3 ± 8,1 37,0 ± 11,5	245 (119-356) 376 (252-557) 464 (368-735) 335 (218-546)	49,8%	LPS, sCD14, Perfil lipídico	Lisado de amebócitos de Limulus: LPS; ELISA: sCD14; Não relatado: perfil lipídico

TARV, terapia antirretroviral; IP, inibidor de protease; DCV, doença cardiovascular; ACTG, AIDS *Clinical Trial Group*; UI, estudo da Universidade de Indiana; LPS, Lipopolissacarídeos; rDNA, DNA bacteriano ribossomal; LBP, Proteína de ligação a LPS (do inglês, *LPS binding protein*); sCD14, CD14 solúvel; EndoCAb, anticorpo do núcleo da endotoxina (do inglês, *Endotoxin core antibody*); PCR, Proteína C reativa; IL-6, interleucina-6; IL-1 β , interleucina 1 β ; TNF- α , fator de necrose tumoral alfa; IP-10, interferon proteína indutível γ 10; sCD163, CD163 solúvel; I-FABP, proteína de ligação a ácidos graxos intestinais (do inglês, *intestinal fatty acid binding protein*); ADMA, dimetilarginina assimétrica (do inglês, *asymmetric dimethylarginine*); SDMA, dimetilarginina simétrica (do inglês, *symmetric dimethylarginine*); TMAO, N-óxido de trimetilamina (do inglês, *trimethylamine-N-oxide*); sFT, fator tecidual solúvel; FvW, Fator de von Willebrand; oxLDL, colesterol LDL oxidado; ELISA, Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Fonte: A autora

A Figura 4 demonstra o número de estudos que avaliaram os biomarcadores de translocação microbiana, inflamação e risco cardiovascular. Os resultados demonstram que os biomarcadores solúveis de translocação microbiana utilizados foram: LPS, rDNA, sCD14, LBP e EndoCAb.

O biomarcador mais frequentemente avaliado foi o sCD14, empregado em 10 (90,9%) estudos (HAISSMAN et al., 2017; KELESIDIS et al., 2012; LEÓN et al., 2017; PEDERSEN et al., 2014; REUS BAÑULS et al., 2014; SANDLER et al., 2011, 2014; STEELE et al., 2014; TIMMONS et al., 2014; VAN DEN DRIES et al., 2015), seguido pela detecção de LPS em 09 (81,8%) estudos (HAISSMAN et al., 2017; KELESIDIS et al., 2012; PEDERSEN et al., 2013, 2014; SANDLER et al., 2011, 2014; STEELE et al., 2014; TIMMONS et al., 2014; VAN DEN DRIES et al., 2015) (Figura 4).

O biomarcador rDNA foi relatado em 03 (27,3%) estudos (LEÓN et al., 2017; REUS BAÑULS et al., 2014; SANDLER et al., 2011), EndoCArb em 02 (18,2%) estudos do mesmo pesquisador (SANDLER et al., 2011, 2014) e LBP também em 02 (18,2%) estudos (SANDLER et al., 2014; VAN DEN DRIES et al., 2015) (Figura 4).

Um amplo número de biomarcadores de inflamação e risco cardiovascular foram utilizados, destacando-se a PCR em seis (54,5%) (HAISSMAN et al., 2017; KELESIDIS et al., 2012; PEDERSEN et al., 2014; SANDLER et al., 2011, 2014; STEELE et al., 2014) e a IL-6 em cinco (45,4%) dos estudos avaliados (LEÓN et al., 2017; REUS BAÑULS et al., 2014; SANDLER et al., 2011, 2014; STEELE et al., 2014) (Figura 4).

Os resultados do presente estudo estão de acordo com uma revisão de literatura que apresenta como principais biomarcadores de: **i)** translocação microbiana: LPS e rDNA; **ii)** resposta inune à produtos bacterianos: LBP, sCD14 e EndoCAb; **iii)** inflamação/ativação inune: PCR, IL-6 e D-dímero (LICHTFUSS et al., 2011). Porém, esta revisão não avaliou as possíveis associações entre os biomarcadores de translocação microbiana, inflamação e risco cardiovascular (LICHTFUSS et al., 2011).

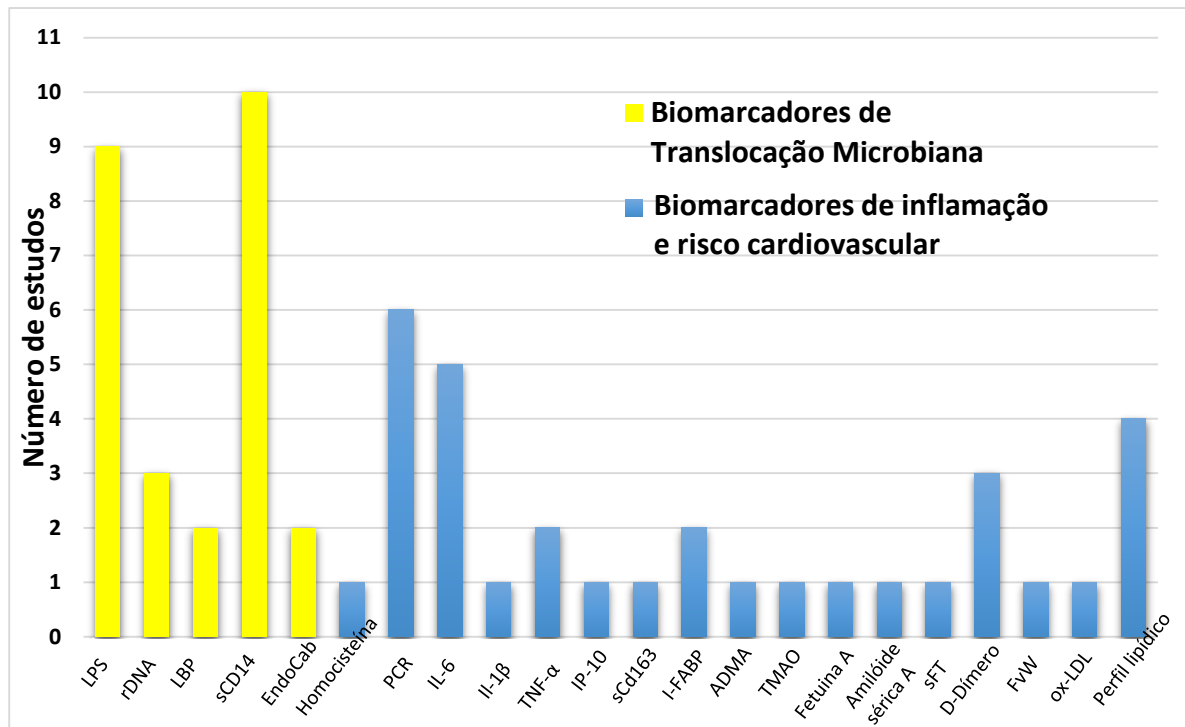


Figura 4 - Número de estudos que avaliaram os biomarcadores de translocação microbiana, inflamação e risco cardiovascular

LPS, Lipopolissacarídeos; rDNA, DNA bacteriano ribossomal; LBP, Proteína de ligação a LPS (do inglês *LPS binding protein*); sCD14, CD14 solúvel; EndoCAB, anticorpo do núcleo da endotoxina (do inglês *Endotoxin core antibody*); PCR, Proteína C reativa; IL-6, interleucina-6; IL-1β, interleucina 1β; TNF-α, fator de necrose tumoral alfa; IP-10, interferon proteína indutível γ 10; sCD163, CD163 solúvel; I-FABP, proteína de ligação a ácidos graxos intestinais (do inglês, *intestinal fatty acid binding protein*); ADMA, dimetilarginina assimétrica (do inglês, *asymmetric dimethylarginine*); TMAO, N-óxido de trimetilamina (do inglês *trimethylamine-N-oxide*); sFT, fator tecidual solúvel; FvW, Fator de von Willebrand; oxLDL, colesterol LDL oxidado. Fonte: A autora

As associações entre sCD14 e biomarcadores de inflamação e risco cardiovascular estão apresentadas na Figura 5. O sCD14 apresentou associação positiva mais frequente com: PCR (KELESIDIS et al., 2012; SANDLER et al., 2011, 2014; STEELE et al., 2014) e IL-6 (REUS BAÑULS et al., 2014; SANDLER et al., 2011, 2014; STEELE et al., 2014), ambos em quatro estudos (36,4%) e triglicerídeos em dois estudos (18,2%) (KELESIDIS et al., 2012; TIMMONS et al., 2014). Porém, houve associação inversa com HDL-C em um estudo (9,1%) (TIMMONS et al., 2014) (Figura 5).

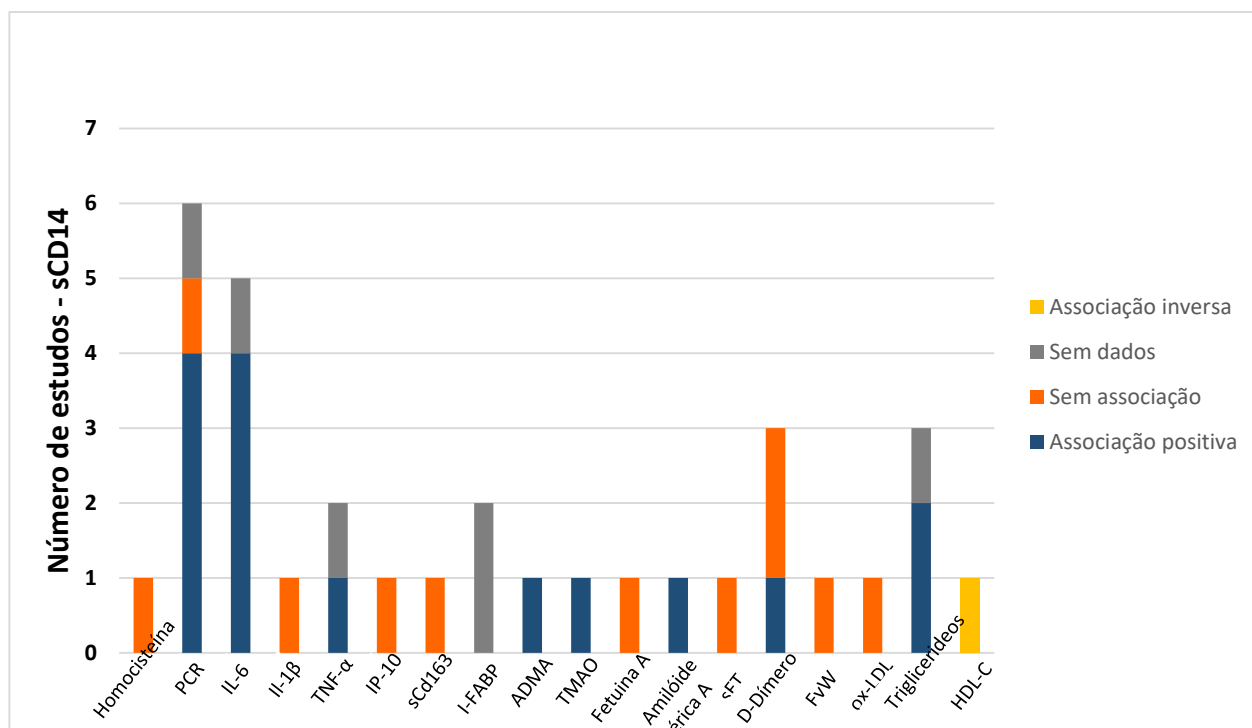


Figura 5 - Associação entre o biomarcador de translocação microbiana sCD14 e os biomarcadores de inflamação e risco cardiovascular

sCD14, CD14 solúvel; PCR, Proteína C reativa; IL-6, interleucina-6; IL-1β, interleucina 1β; TNF-α, fator de necrose tumoral alfa; IP-10, interferon proteína indutível γ 10; sCD163, CD163 solúvel; I-FABP, proteína de ligação a ácidos graxos intestinais (do inglês, intestinal fatty acid binding protein); ADMA, dimetilarginina assimétrica (do inglês, *asymmetric dimethylarginine*); TMAO, N-óxido de trimetilamina (do inglês *trimethylamine-N-oxide*); sFT, fator tecidual solúvel; FvW, Fator de von Willebrand; oxLDL, colesterol LDL oxidado. Fonte: A autora

A associação de sCD14, produzido por monócitos em resposta ao estímulo de lipopolissacarídeos (ZANONI; GRANUCCI, 2013), com PCR e IL-6, tradicionais biomarcadores de inflamação sistêmica e risco cardiovascular (RIDKER, 2003; SARWAR et al., 2012), e triglicédeos, uma fonte de energia para macrófagos (KELESIDIS et al., 2012), assim como um fator de risco independente para doença cardiovascular (CULLEN, 2000), demonstram a interligação entre translocação microbiana, inflamação e doença cardiovascular.

As associações entre LPS e biomarcadores de inflamação e risco cardiovascular estão apresentadas na Figura 6. O LPS apresentou associação positiva apenas com o perfil lipídico: triglicédeos (18,2%) (PEDERSEN et al., 2013; TIMMONS et al., 2014), colesterol (9,1%) (PEDERSEN et al., 2013) e LDL-C (9,1%) (PEDERSEN et al., 2013) (Figura 6).

Para o biomarcador de translocação microbiana rDNA houve associação positiva apenas com IL-6 em dois (18,2%) estudos (LEÓN et al., 2017; REUS BAÑULS et al., 2014) e com TNF-α em um (9,1%) estudo (REUS BAÑULS et al., 2014). LBP apresentou associação

positiva com PCR e IL-6 (SANDLER et al., 2014); enquanto o EndoCAb não apresentou nenhuma associação com os biomarcadores de inflamação e risco cardiovascular.

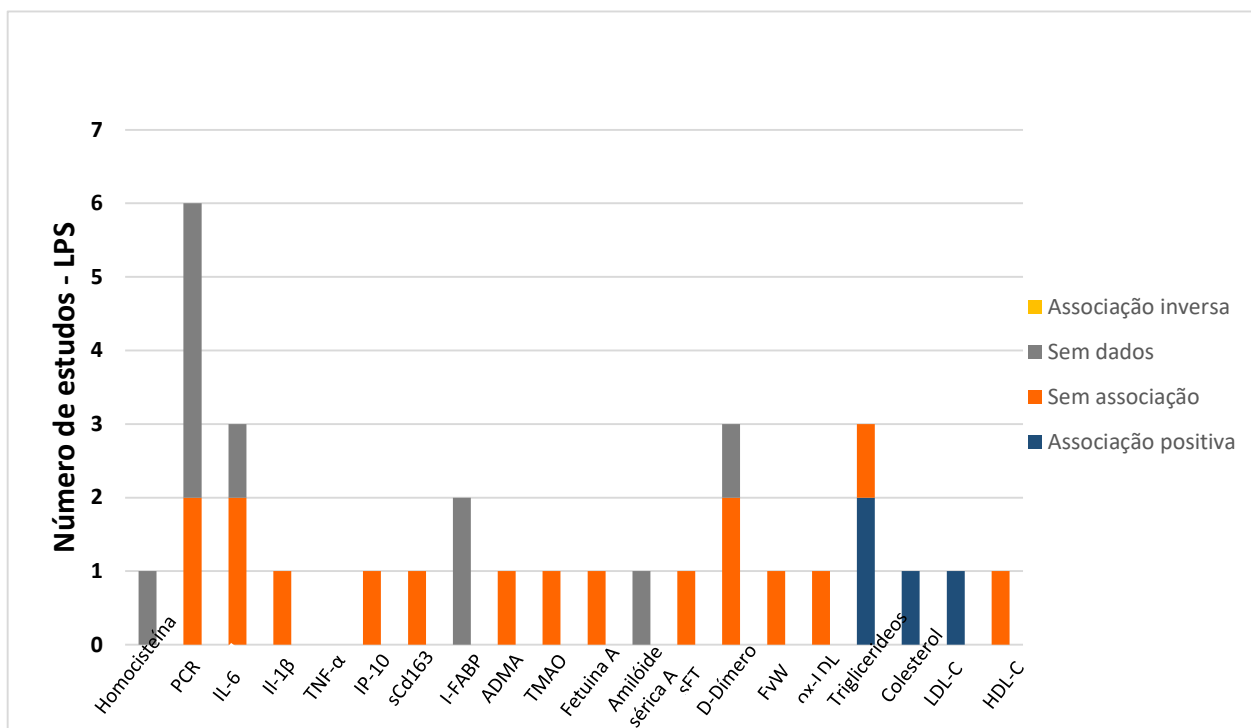


Figura 6 - Associação entre o biomarcador de translocação microbiana LPS e os biomarcadores de inflamação e risco cardiovascular

LPS, Lipopolissacarídeo; PCR, Proteína C reativa; IL-6, interleucina-6; IL-1β, interleucina 1β; TNF-α, fator de necrose tumoral alfa; IP-10, interferon proteína indutível γ 10; sCD163, CD163 solúvel; I-FABP, proteína de ligação a ácidos graxos intestinais (do inglês, intestinal fatty acid binding protein); ADMA, dimetilarginina assimétrica; TMAO, N-óxido de trimetilamina (do inglês trimethylamine-N-oxide); sFT, fator tecidual solúvel; FvW, Fator de von Willebrand; oxLDL, colesterol LDL oxidado. Fonte: A autora

Os biomarcadores de translocação microbiana também foram avaliados para associações entre si, sendo que apenas um estudo demonstrou correlação entre LPS e sCD14 (VAN DEN DRIES et al., 2015). Na maioria dos estudos não houve correlação entre LPS e sCD4, LBP e sCD14, LPS e LBP, sCD14 e EndoCAb, LPS e EndoCAb (KELESIDIS et al., 2012; PEDERSEN et al., 2014; SANDLER et al., 2014; STEELE et al., 2014).

Com relação a metodologia empregada, os níveis plasmáticos de sCD14 foram avaliados por ELISA e LPS por Lisado de Amebócitos de *Limulus* (LAL) (Tabela 2). O método mais frequentemente utilizado para quantificar o LPS no plasma é o LAL, que utiliza uma série de reações enzimáticas que imitam a cascata de coagulação (LICHTFUSS et al., 2011). Porém, este ensaio apresenta alta sensibilidade e a contaminação durante a preparação da amostra e/ou na realização do teste podem ocorrer facilmente (LICHTFUSS et al., 2011). Além disso, as

reações enzimáticas dependem criticamente do tempo e da temperatura, e podem ser afetadas por inúmeros inibidores presentes no plasma (LICHTFUSS et al., 2011).

Deve ser ressaltado que a heterogeneidade na estrutura, solubilidade, estado físico e bioatividade do LPS colocam limitações importantes na interpretação dos testes de endotoxina plasmática (MUNFORD, 2016). Desta forma, a associação dos níveis de endotoxina plasmática com marcadores inflamatórios tem sido inconsistente (MUNFORD, 2016). Portanto, ao contrário do LPS, com importantes limitações, a quantificação de sCD14 é altamente reprodutível e pode ser usado de forma confiável (LICHTFUSS et al., 2011).

Outros biomarcadores de inflamação e risco cardiovascular que apresentaram associação com sCD14 foram: fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (REUS BAÑULS et al., 2014), dimetilarginina assimétrica (ADMA do inglês, *asymmetric dimethylarginine*) e seu estereoisômero dimetilarginina simétrica (SDMA do inglês, *symmetric dimethylarginine*) (PEDERSEN et al., 2014), N-óxido de trimetilamina (TMAO do inglês, *trimethylamine-N-oxide*) (HAISSMAN et al., 2017), amiloide sérica A e D-dímero (SANDLER et al., 2011). Porém, estes dados foram relatados apenas um vez e devem ser interpretados com cautela (Figura 4).

A única associação encontrada por van den Dries et al. (2015) foi a correlação entre os biomarcadores de translocação microbiana, sCD14 e LPS ($r=0,255$; $p=0,003$); porém, houve uma tendência para uma correlação positiva entre níveis plasmáticos de sCD14 e o Fator de von Willebrand (FvW) ($r=0,184$; $p=0,078$), que está relacionado ao aumento de eventos cardiovasculares (KATO et al., 2018). Não houve correlação entre os biomarcadores FvW e LPS; FvW e LBP; sCD14 e LBP; LPS e LBP (VAN DEN DRIES et al., 2015).

O TMAO, um metabolito da microbiota intestinal considerado biomarcador cardiovascular independente dos tradicionais fatores de risco (BERGERON et al., 2016) também foi avaliado por Haissman et al. (2017) que demonstraram associação de sCD14 com TMAO (regressão linear simples; $r=0,381$; $p=0,008$) em indivíduos infectados pelo HIV não tratados, mas não em indivíduos infectados pelo HIV em TARV. Porém, nenhuma associação entre LPS e TMAO foi encontrada (HAISSMAN et al., 2017). Avaliando os modelos de regressão linear multivariada, a sCD14 permaneceu preditor independente de TMAO após ajuste para idade, sexo, tabagismo e carga viral (HAISSMAN et al., 2017). Deve ser ressaltado, que um estudo recente demonstrou que TMAO foi associado ao aumento do risco de placa carotídea em infectados pelo HIV e também exibiu correlação com o biomarcador sCD14 (SHAN et al., 2018).

No estudo desenvolvido por Kelesidis et al. (2012) foi observado associações no modelo de regressão simples entre os níveis de sCD14 com níveis de PCR-us ($p < 0,001$) e de triglicérides ≥ 150 mg/dL ($p = 0,027$), os resultados para regressão multivariada foram semelhantes. Porém, não houve alteração nos níveis de LPS ao longo do tempo dentro dos grupos de estudo e também não apresentou associação com sCD14; provavelmente pela variabilidade individual da resposta do hospedeiro ao LPS, em vez da quantidade de LPS na ativação dos macrófagos (KELESIDIS et al., 2012). Quando esse estudo avaliou a espessura das camadas íntima e média das artérias carótidas por ultrassonografia demonstrou que os biomarcadores sCD14 e LPS estão associados com a progressão da aterosclerose subclínica, proporcionando uma potencial etiologia unificadora para o risco aumentado de doença cardiovascular em indivíduos infectados pelo HIV (KELESIDIS et al., 2012).

León et al. (2017), utilizaram como biomarcador de translocação microbiana o DNA bacteriano ribossomal (rDNA) e demonstraram a relação entre a presença do rDNA e o nível de IL-6. Indivíduos infectados pelo HIV com translocação microbiana apresentaram valores medianos significativamente maiores ($p = 0,001$) de IL-6, 34 (17 – 51) pg/mL, em relação aos indivíduos sem translocação microbiana, 4,94 (2,4 – 6,2) pg/mL (LEÓN et al., 2017).

Pedersen et al. (2013) apresentaram os resultados para os biomarcadores apenas de 50 indivíduos infectados pelo HIV divididos em tercís (17, 16 e 17 sujeitos, respectivamente) de acordo com o nível de LPS; 46,1 (43,2 a 49,1) pg/mL, 62,4 (60,0 a 64,7) pg/mL e 84,7 (72,0 a 97,5) pg/mL, respectivamente. O maior nível de triglicérides foi encontrado no terceiro tercil em comparação com o primeiro e segundo ($p = 0,006$ e $p = 0,046$, respectivamente) (PEDERSEN et al., 2013). Além disso, o colesterol total foi maior no segundo e terceiro tercís em comparação com o primeiro ($p = 0,022$ e $p = 0,016$, respectivamente) e LDL-C foi maior no segundo e terceiro tercís em comparação com o primeiro ($p = 0,009$ e $p = 0,002$, respectivamente) (PEDERSEN et al., 2013). Não houve diferença nas concentrações de HDL-C. Associações significativas foram encontradas entre LPS e triglicerídeos ($r = 0,450$; $p = 0,001$), colesterol total ($r = 0,147$; $p = 0,005$) e LDL-C ($r = 0,110$; $p = 0,018$) (PEDERSEN et al., 2013).

Outro estudo realizado por Pedersen et al. (2014) demonstrou correlação de sCD14 com biomarcadores de disfunção endotelial, ADMA e SDMA ($r = 0,38$; $p = 0,008$ e $r = 0,51$; $p < 0,001$, respectivamente); que contribuem para o comprometimento da função endotelial pela inibição da síntese do óxido nítrico. Em contraste, o LPS não se correlacionou com a ADMA ou SDMA ($r = -0,02$; $p = 0,900$ e $r = 0,02$; $p = 0,889$, respectivamente) (PEDERSEN et al., 2014). Além disso, este estudo não demonstrou associações entre sCD14, LPS, PCR-us e D-dímero (PEDERSEN et al., 2014).

Reus Bañuls et al. (2014) demonstraram que indivíduos infectados pelo HIV, em TARV, com valores superiores dos marcadores inflamatórios IL-6 e TNF- α apresentaram maior frequência de translocação bacteriana e história de doença cardiovascular; com correlação entre os biomarcadores sCD14 e IL-6 ($r=0,28$; $p=0,01$), sCD14 e TNF- α ($r=0,40$; $p<0,001$). Os autores também demonstraram a associação (modelo de regressão simples) dos altos valores dos marcadores inflamatórios com a presença de rDNA, sCD14 e história de eventos cardiovasculares (REUS BAÑULS et al., 2014). Porém, na análise multivariada, os valores de IL-6 e TNF- α só foram associados independentemente com presença de DNA bacteriano (*Odds Ratio* 62, $p=0,0001$) e história de eventos cardiovasculares (*Odds Ratio* 25, $p=0,01$) (REUS BAÑULS et al., 2014).

No estudo de Sandeler et al. (2011) os biomarcadores foram avaliados de acordo com a carga viral plasmática: indivíduos com níveis de RNA do HIV ≤ 400 cópias/mL ($n=420$) e com níveis de RNA do HIV > 400 cópias/mL ($n=155$), em TARV. No grupo de indivíduos com níveis de RNA do HIV ≤ 400 cópias/mL, houve correlação de sCD14 com IL-6 ($r=0,18$; $p<0,001$), amiloide sérica A ($r=0,16$; $p<0,001$), PCR-us ($r=0,10$; $p=0,04$) e D-dímero ($r=0,11$; $p=0,03$). Em contraste, nos indivíduos com níveis detectáveis de RNA do HIV, sCD14 apresentou correlação com IL-6 ($r=0,26$; $p<0,001$), amiloide sérica A ($r=0,18$; $p=0,004$) e PCR-us ($r=0,18$; $p=0,005$) (SANDLER et al., 2011). Como os efeitos da TARV na permeabilidade intestinal e na resposta imunológica aos produtos microbianos não foram bem caracterizados, esse estudo examinou a associação entre marcadores de translocação microbiana e inflamação no subconjunto não tratado ($n=117$), sendo que houve correlação de sCD14 com IL-6 ($r=0,35$; $p<0,001$) e D-dímero ($r=0,26$; $p=0,006$) (SANDLER et al., 2011). Porém, esses resultados devem ser interpretados com cuidado, porque o número de indivíduos avaliados para os biomarcadores não representam a amostra do total de inscritos no estudo.

Outro estudo realizado por Sandler et al. (2014) não demonstrou correlação entre os biomarcadores de translocação microbiana LPS, sCD14 e EndoCAb; assim como, com outros biomarcadores utilizados no estudo. No entanto, níveis de LBP, IL-6 e PCR, todos reagentes de fase aguda, foram correlacionados significativamente entre si (SANDLER et al., 2014).

Na pesquisa desenvolvida por Steele et al. (2014), foram observadas associações do sCD14 com PCR-us ($r=0,292$; $p=0,008$) e IL-6 ($r=0,418$; $p<0,0001$), em indivíduos infectados pelo HIV. Porém, não apresentou associação com a proteína de ligação a ácidos graxos intestinais (iFABP do inglês, *Intestinal fatty acid binding protein*) ($r=-0,019$; $p=0,870$) (STEELE et al., 2014). Com relação ao biomarcador de translocação microbiana LPS, houve uma tendência para uma correlação positiva com PCR-us ($r=0,206$; $p=0,076$) e IL-6 ($r=0,209$;

$p=0,089$), mas nenhum alcançou significância estatística nessa coorte (STEELE et al., 2014). Além disso, o biomarcador LPS não se correlacionou com sCD14s ($r=0,186$; $p=0,112$) (STEELE et al., 2014).

Timmons et al. (2014) avaliaram as associações entre os biomarcadores para todos os indivíduos infectados pelo HIV incluídos no estudo e de forma isolada para cada subgrupo das duas coortes avaliadas. Com relação a população total de indivíduos infectados pelo HIV, houve correlação positiva do LPS com triglicérides ($n=167$, $r=0,32$; $p<0,01$) e correlação negativa de sCD14 com HDL-C ($n=166$, $r=-0,21$; $p<0,01$) (TIMMONS et al., 2014). O grupo da coorte *AIDS Clinical Trial Group* tanto antes como após tratamento houve correlação de LPS com triglicérides ($n=81$, $r=0,35$; $p<0,01$, $n=79$, $r=0,81$; $p<0,01$, respectivamente) (TIMMONS et al., 2014). Enquanto que, a coorte da Universidade de Indiana apresentou associações apenas para o grupo em TARV, com correlação positiva para LPS e sCD14 com triglicérides ($n=40$, $r=0,33$; $p=0,04$, $n=42$, $r=0,35$; $p<0,02$, respectivamente) e correlação negativa de sCD14 com HDL-C ($n=41$, $r=-0,32$; $p<0,04$) (TIMMONS et al., 2014). Porém, esses resultados devem ser interpretados com cuidado, porque o número de indivíduos avaliados para os biomarcadores não representam a amostra do total de inscritos em cada subgrupo do estudo.

Essa revisão sistemática resume os principais biomarcadores de translocação microbiana, inflamação e risco cardiovascular utilizados atualmente e as possíveis associações entre eles na infecção pelo HIV. O ponto forte desta revisão para prática clínica foi a compreensão que entre os biomarcadores de translocação microbiana, o sCD14 apresentou maior associação com biomarcadores de inflamação e risco cardiovascular.

No entanto, é necessário ponderar sobre algumas das limitações desse trabalho, como as diferenças metodológicas entre estudos, principalmente com relação a avaliação dos biomarcadores em diferentes grupos e subgrupos de indivíduos infectados pelo HIV. Desta forma, deve ser levado em consideração que os resultados das associações entre os biomarcadores podem ser influenciados por diferenças na população de indivíduos infectados pelo HIV avaliados nos estudos. Além disso, vários estudos não avaliaram os biomarcadores com relação a população total de infectados pelo HIV incluídos no estudo.

Essa pesquisa considerou os biomarcadores sanguíneos solúveis que podem ser inseridos no diagnóstico do laboratório clínico, visando a interligação entre translocação microbiana, inflamação e risco cardiovascular. Apesar do amplo número de biomarcadores de inflamação e risco cardiovascular que foram relatados, destaca-se a PCR, que apresentou associação com os biomarcadores de translocação microbiana; no entanto, observou-se que importantes biomarcadores envolvidos na fisiopatologia de DCV não foram avaliados.

4.3 SEGUNDA ETAPA: PESQUISA QUANTITATIVA

Com base nos resultados da revisão sistemática, ressalta-se a importância de verificar a relação dos biomarcadores de translocação microbiana com o potencial risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, levando em consideração os diferentes níveis plasmáticos de PCR-us. Além disso, o biomarcador de inflamação e risco cardiovascular MPO não foi avaliado em adultos infectados pelo HIV com relação aos biomarcadores de translocação microbiana, demonstrando o caráter inédito desta segunda etapa da pesquisa. Ao mesmo tempo, torna-se importante investigar a possível influência do estado imunológico, dos diferentes esquemas de antirretrovirais utilizados e do tempo de infecção pelo HIV nos biomarcadores de translocação microbiana, inflamação e risco cardiovascular.

4.3.1 Materiais e Métodos

4.3.1.1 Delineamento do estudo

Os participantes infectados pelo HIV foram selecionados no Laboratório Municipal Alfredo Berger, no Município de Ponta Grossa – Paraná. Todos os voluntários foram devidamente informados sobre os procedimentos e objetivos deste estudo, e após concordarem, assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido. O estudo foi aprovado pelo Núcleo de Educação Permanente – NEP, da Prefeitura Municipal de Ponta Grossa (ANEXO B) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), parecer nº 1.682.031 (ANEXO C). Esta pesquisa foi realizada em conformidade com a Declaração de Helsinki.

As informações pessoais (idade e sexo), os dados da história clínica (diabetes *mellitus*, hipertensão arterial, dislipidemia, tabagismo, alcoolismo, toxicodependência, presença de infecções ou doenças inflamatórias sistêmicas e existência de história familiar positiva para doença cardiovascular); assim como, a história atual da infecção pelo HIV (data do diagnóstico, uso ou não de antirretrovirais, classe de antirretroviral utilizada, data de início da terapia e presença de coinfeções), foram obtidos do prontuário médico dos participantes; fornecidos pelo Serviço de Assistência Especializada/Centro de Testagem e Aconselhamento (SAE/CTA).

Foram utilizados como critérios de inclusão: indivíduos infectados pelo HIV em seguimento clínico e uso de TARV de forma regular por um período mínimo de 6 meses, idade superior a 18 anos e jejum de 12 horas. Os critérios de exclusão foram: ingestão de álcool (72 horas) e atividade física vigorosa (24 horas) antecedendo a coleta de sangue, os tradicionais

fatores de risco cardiovascular (diabetes *mellitus*, hipertensão arterial, dislipidemia, tabagismo, alcoolismo e toxicodependência), presença de coinfeções (hepatite B e hepatite C) ou infecções oportunistas (toxoplasmose e citomegalovírus) ou doenças inflamatórias sistêmicas, existência de história familiar positiva para doença cardiovascular e indivíduos sem adesão ao tratamento antirretroviral.

Foram analisados os seguintes biomarcadores plasmáticos: **i)** translocação microbiana método direto: LPS, **ii)** translocação microbiana métodos indiretos: LBP (ativação imune à produtos bacterianos) e sCD14 (ativação de monócitos/macrófagos); **iii)** inflamação e risco cardiovascular: PCR-us e MPO; **iv)** imunológicos: linfócitos T CD4+ e T CD8+ e **v)** virológico: carga viral.

Foi realizado um estudo caso-controle, sendo que os participantes da pesquisa foram divididos em diferentes grupos:

- 1) Potencial aumento do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, de acordo com os níveis plasmáticos de PCR-us e MPO, conforme os valores plasmáticos de *cutoff* demonstrado na literatura. Os indivíduos infectados pelo HIV foram categorizados de acordo com o biomarcador PCR-us em: **i)** Baixo Risco ≤ 3 mg/L e **ii)** Alto Risco > 3 mg/dL (RIDKER, 2003). Segundo o risco cardiovascular estratificado pela MPO, os voluntários foram enquadrados como: **i)** MPO < 350 ng/mL e **ii)** MPO ≥ 350 ng/mL (BALDUS et al., 2003).
- 2) Estado imunológico, detectado pela contagem de células T CD4+. Segundo a contagem de células T CD4+ os voluntários foram divididos em: **i)** linfócitos T CD4+ inferior a 500 células/mm³, **ii)** linfócitos T CD4+ igual ou superior a 500 células/mm³.
- 3) Esquema terapêutico utilizado: **i)** dois inibidores da transcriptase reversa análogo de nucleosídeos e nucleotídeos (ITRN/ITRNt) associados a um inibidor da transcriptase reversa não análogo de nucleosídeos (ITRNN); **ii)** dois ITRN/ITRNt associados a um inibidor de protease com reforço de ritonavir (IP/r) e **iii)** dois ITRN/ITRNt associados a um inibidor de integrase (INI).
- 4) Tempo de infecção pelo HIV, identificado pela data do diagnóstico, os voluntários foram categorizados em Quartis: **i)** 1º Quartil, $< 3,0$ anos; **ii)** 2º Quartil, 3,0 – 8,0 anos; **iii)** 3º Quartil, 9,0 – 13,0 anos e **iv)** 4º Quartil $> 13,0$ anos.

4.3.1.2 Coleta e Processamento da amostra biológica

A coleta de sangue venoso foi realizada pelo sistema a vácuo. O sangue total coletado (10,0 mL) foi distribuído em três tubos com anticoagulante EDTA K₂ e um tubo de preparação de plasma, EDTA K₂ com gel separador (BD Vacutainer® PPT™, Becton Dickinson-Biociences, San Jose, Califórnia, USA).

O processamento da amostra foi realizado da seguinte forma:

- i) Primeiro tubo de EDTA K₂: foi utilizado o sangue total para análise dos parâmetros imunológicos referentes à contagem absoluta e percentual de células T CD4⁺, T CD8⁺, relação CD4/CD8, analisado no mesmo dia da coleta de sangue venoso;
- ii) Segundo e Terceiro tubos de EDTA K₂: foram centrifugados dentro de uma hora após a coleta por 15 minutos, para obtenção de plasma. Alíquotas desse plasma foram transferidas para tubos de polipropileno estéril com subsequente armazenagem -80° C, para posterior análise dos biomarcadores PCR-us, MPO, LBP e sCD14. Outra alíquota do plasma foi transferida para tubos de vidro estéreis para armazenamento a -20° C, para posterior análise de LPS.
- iii) Tubo de EDTA K₂ para preparação de plasma, com gel separador: foi centrifugado por 15 minutos dentro de duas horas após a coleta e armazenado entre 2° a 8° C para posterior análise da carga viral.

4.3.1.3 Análise laboratorial

4.3.1.3.1 Biomarcador de Translocação Microbiana – Direto

4.3.1.3.1.1 Ensaio cinético quantitativo para determinação de LPS

A dosagem de endotoxinas plasmáticas foi realizada pelo ensaio cinético quantitativo *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL) Kinetic-QCL™ (Lonza Inc., Walkersville, USA), utilizando materiais estéreis, qualificados para testar endotoxinas. Inicialmente foi realizada uma curva-padrão. O controle padrão de endotoxinas foi reconstituído com água reagente para LAL produzindo uma solução contendo 50 unidades de endotoxinas por mililitro (EU/mL) e agitado por 15 minutos no vórtex. O estabelecimento de uma curva-padrão com quantidade de endotoxinas conhecidas é necessário para determinar a concentração de endotoxinas em amostras com quantidades desconhecidas. Foram realizadas diluições a partir desse padrão de

concentração conhecida de *Escherichia coli*, utilizando tubos de vidro apirogênicos, tamanho 13 mm x 100 mm (Lonza Inc., Walkersville, USA), chegando-se às seguintes concentrações finais de endotoxinas: 50 UE/mL, 5 UE/mL, 0.50 UE/mL, 0.05 UE/mL e 0.005 EU/mL (Quadro 1).

Quadro 1 - Diluição do controle padrão de endotoxinas para realização da curva-padrão

Padrão de endotoxina	EU/mL	Volume de padrão de endotoxina	Volume de água reagente para LAL
5	50	Controle padrão de endotoxina puro	-
4	5	0.1 mL do padrão 5	0.9 mL
3	0.50	0.1 mL do padrão 4	0.9 mL
2	0.05	0.1 mL do padrão 3	0.9 mL
1	0.005	0.1 mL do padrão 2	0.9 mL

Fonte: Baseado em Ensaio cinético tradicional *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL), Guia rápido de procedimento, Lonza Inc., Walkersville, USA.

As amostras de plasma dos participantes da pesquisa foram vigorosamente agitadas por 1 minuto no vórtex, em seguida diluídas 1:25 em água reagente para LAL em tubos de vidro apirogênicos e novamente vigorosamente agitadas por 1 minuto antes da pipetagem nas cavidades apropriadas da microplaca. A agitação da amostra antes e após a diluição é importante porque a endotoxina tende a se aderir ao vidro. Em uma placa apirogênica de 96 poços, foram adicionados 100 µL de água apirogênica (branco da reação), os padrões de endotoxina e as amostras coletadas em duplicata. A placa foi incubada no leitor cinético a $37 \pm 1^\circ \text{C}$ por 10 minutos, o qual estava acoplado a um microcomputador com *software* WinkQCL™ (Lonza Inc., Walkersville, USA) específico para gerenciamento, execução e emissão de relatórios. Em seguida, foram adicionados em cada poço da placa 100 µL do reagente cinético cromogênico do LAL (reconstituído imediatamente antes do uso, com agitação suave) utilizando uma micropipeta multicanal com ponteiros apirogênicos. Após o início do ensaio cinético, o *software* da leitora de microplacas monitorava, de forma contínua durante todo o ensaio, a absorvância a 340 nm em cada poço da microplaca. As concentrações de LPS foram derivadas da curva padrão de concentrações conhecidas do controle endotoxinas, obtida pelo leitor de microplacas e *Software* WinKQCL™ (Lonza Inc., Walkersville, USA), com resultado corrigido para diluição inicial da amostra. Os resultados foram relatados em EU/mL.

4.3.1.3.2 Biomarcadores de Translocação Microbiana – Indiretos

4.3.1.3.2.1 Ativação imune à produtos bacterianos: ELISA para determinação de LBP

Os níveis plasmáticos de LBP foram determinados pela reação imunoenzimática ELISA no formato sanduíche de fase sólida (Human LBP ELISA Kit, Sigma-Aldrich, Inc, St. Louis, Missouri, EUA). As amostras de plasma foram diluídas 1:1.000 com tampão fornecido pelo kit antes da realização do teste. Em seguida, a solução padrão foi reconstituída com 400 µL de diluente produzindo uma solução de 200 ng/mL. Foram realizadas diluições a partir desse padrão de concentração conhecida, para a realização da curva-padrão, chegando-se às seguintes concentrações finais: 200 ng/mL (padrão de LBP humano não diluído), 80 ng/mL, 32 ng/mL, 12.80 ng/mL, 5.120 ng/mL, 2.048 ng/mL, 0.819 ng/mL e o diluente do ensaio foi utilizado como padrão zero (0 ng/mL) (Quadro 2).

Quadro 2 - Diluição do padrão de LBP humano para realização da curva-padrão

Padrão	ng/mL	Volume de padrão de LBP	Volume de diluente
7	200	Padrão de LBP puro	-
6	80	180 µL do padrão 7	270 µL
5	32	180 µL do padrão 6	270 µL
4	12.80	180 µL do padrão 5	270 µL
3	5.120	180 µL do padrão 4	270 µL
2	2.048	180 µL do padrão 3	270 µL
1	0.819	180 µL do padrão 2	270 µL
0	0	-	270 µL

Fonte: Baseado em *Human LBP ELISA Kit*, Sigma-Aldrich, Inc, St. Louis, Missouri, EUA.

Aos orifícios da placa revestidos com anti-humano LBP foram adicionados 100 µL de cada padrão e amostras pré-diluídas, em duplicata. Após incubação por 2 horas e trinta minutos à temperatura ambiente, sob agitação suave e constante, o sobrenadante foi desprezado e a placa lavada 4 vezes com o tampão de lavagem (aproximadamente 300 µL/poço). Em seguida, foi incubada com 100 µL/poço do anticorpo de detecção biotinilado para LBP (preparado com 100 µL de diluente e posteriormente diluído 1:80) durante uma hora à temperatura ambiente, sob agitação suave e constante. Após repetir o procedimento de lavagem da placa, foram adicionados 100 µL/poço da solução da enzima estreptoavidina peroxidase (diluída 1:500) e incubação por 45 minutos à temperatura ambiente, sob agitação suave e constante. Em seguida,

o ciclo de lavagem da placa foi repetido e a reação revelada pela adição de 100 µL/poço de 3,3',5,5' - tetrametilbenzidina e incubação de 30 minutos à temperatura ambiente, protegida da luz e sob agitação suave e constante. A reação foi bloqueada adicionando-se 50 µL/poço de H₂SO₄ (0.2 N), avaliando-se a densidade óptica das amostras a 450 nm, imediatamente após o bloqueio da reação. Os valores de absorbância para o ELISA foram determinados usando um leitor de microplacas *Synergy H1* com controle e *software* de leitura dos dados *BioTek's Gen5™* (BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, EUA). A concentração final foi determinada com referência a curva-padrão e corrigido para a diluição da amostra. Os resultados foram transformados para µg/mL.

4.3.1.3.2.2 Ativador de monócitos/macrófagos: ELISA para determinação de sCD14

Os níveis plasmáticos de sCD14 humano foram quantificados, por ELISA no formato sanduíche de fase sólida (Quantikine ELISA; R & D Systems Inc., Minneapolis, USA). As amostras de plasma foram diluídas 1:200 com tampão fornecido pelo kit antes da realização do teste. Em seguida, a solução padrão foi reconstituída com o diluente do calibrador (diluído 1:5) produzindo uma solução de 16.000 pg/mL. Foram realizadas diluições a partir desse padrão de concentração conhecida, para a realização da curva-padrão, chegando-se às seguintes concentrações finais: 16.000 pg/mL (padrão de CD14 humano não diluído), 8.000 pg/mL, 4.000pg/mL, 2.000 pg/mL, 1.000 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/mL e o diluente do ensaio foi utilizado como padrão zero (0 ng/mL) (Quadro 3).

Quadro 3 - Diluição do padrão de CD14 humano para realização da curva-padrão

Padrão	pg/mL	Volume de padrão de CD14	Volume de diluente
7	16.000	Padrão de CD14 puro	-
6	8.000	500 µL do padrão 7	500 µL
5	4.000	500 µL do padrão 6	500 µL
4	2.000	500 µL do padrão 5	500 µL
3	1.000	500 µL do padrão 4	500 µL
2	500	500 µL do padrão 3	500 µL
1	250	500 µL do padrão 2	500 µL
0	0	-	500 µL

Fonte: Baseado em *Human CD14 Immunoassay, Quantikine®ELISA kit, R & D Systems Inc., Minneapolis, USA*.

Aos orifícios da placa revestidos com anticorpo monoclonal específico para CD14 humano foram adicionados 100 µL/poço de uma base proteica tamponada. Em seguida, foram adicionados 100 µL/poço de cada padrão e amostras pré-diluídas, em duplicata. Após incubação por 3 horas à temperatura ambiente o sobrenadante foi desprezado e a placa lavada 4 vezes com o tampão de lavagem (aproximadamente 400 µL/poço). Em seguida, foi incubada com 200µL/poço do conjugado de CD14 humano durante uma hora à temperatura ambiente. Posteriormente, o ciclo de lavagem da placa foi repetido e a reação revelada pela adição 200µL/poço da solução de substrato (reagentes de cor A e B misturados em volumes iguais, 15 minutos antes do uso) e incubação de 30 minutos à temperatura ambiente e protegida da luz. A reação foi bloqueada adicionando-se 50 µL/poço de H₂SO₄ (2 N), avaliando-se a densidade óptica das amostras a 450 nm, imediatamente após o bloqueio da reação. Os valores de absorbância para o ELISA foram determinados usando um leitor de microplacas *Synergy H1* com controle e *software* de leitura dos dados *BioTek's Gen5™* (BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, EUA). A concentração final foi determinada com referência a curva-padrão e corrigido para a diluição da amostra. Os resultados foram transformados para µg/mL.

4.3.1.3.3 Biomarcadores de Inflamação e Risco Cardiovascular

4.3.1.3.3.1 Método imunoturbidimétrico com látex para determinação quantitativa de PCR

Os níveis de PCR-us foram obtidos pelo método de imunoturbidimetria com partículas marcadas, em aparelho automatizado CT 300i (Wiener lab., Rosario, Argentina), utilizando o kit CRP hs (Wiener lab., Rosario, Argentina). O princípio do método consiste em que a PCR presente na amostra aglutina as partículas de látex recobertas com anticorpos anti-PCR. A turbidez causada pela aglutinação das partículas de látex é proporcional à concentração de PCR na amostra, sendo medida por espectrofotometria no equipamento, em absorbância de 570 nm. Primeiro o equipamento foi calibrado com os calibradores 1, 3, 4, 5, 6 e 7 do PCR Calibrador em série Turbitest AA (Wiener lab., Rosario, Argentina), com diferentes níveis de PCR humana. Em seguida, foi processado o PCR Control N Turbitest AA (Wiener lab., Rosario, Argentina). Posteriormente, as amostras dos participantes da pesquisa foram processadas no equipamento e os resultados liberados em mg/L.

4.3.1.3.3.2 ELISA para determinação de MPO

Os níveis de MPO no sangue periférico foram determinados por ELISA no formato sanduíche em fase sólida (Immunology Consultants Laboratory, USA). As amostras de plasma foram diluídas 1/10 antes da realização do teste. Em seguida, o calibrador MPO humano foi reconstituído com 1.0 mL de água destilada produzindo uma solução de concentração de 250ng/mL. Foram realizadas diluições a partir desse padrão de concentração conhecida, para a realização da curva-padrão, chegando-se às seguintes concentrações finais: 120 ng/mL, 60ng/mL, 30 ng/mL, 15 ng/mL, 7.5 ng/mL, 3.75 ng/mL, 1.875 ng/mL e o diluente do ensaio foi utilizado como padrão zero (0 ng/mL) (Quadro 4).

Quadro 4 - Diluição do calibrador MPO humano para realização da curva-padrão

Padrão	ng/mL	Volume adicionado ao diluente	Volume de diluente
7	120	240 µL do calibrador MPO humano	260 µL
6	60	250 µL do padrão 7	250 µL
5	30	250 µL do padrão 6	250 µL
4	15	250 µL do padrão 5	250 µL
3	7.5	250 µL do padrão 4	250 µL
2	3.75	250 µL do padrão 3	250 µL
1	1.875	250 µL do padrão 2	250 µL
0	0	-	500 µL

Fonte: Baseado no *Immunoperoxidase Assay for Determination of Myeloperoxidase in Human Samples Kit*, Immunology Consultants Laboratory, USA.

Aos orifícios da placa revestidos com anticorpos anti-humano MPO foram adicionados 100 µL de cada padrão e amostras pré-diluídas, em duplicata. Após incubação por uma hora à temperatura ambiente, o sobrenadante foi desprezado e a placa lavada 4 vezes com o tampão de lavagem. Em seguida, foi incubada com 100 µL/poço do conjugado enzima-anticorpo durante 20 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, o ciclo de lavagem da placa foi repetido e a reação revelada pela adição de 100 µL/poço de 3,3',5,5' - tetrametilbenzidina e incubação de 10 minutos à temperatura ambiente e protegida da luz. A quantidade de enzima ligada varia diretamente com a concentração de MPO na amostra testada. A reação foi bloqueada adicionando-se 100 µL/poço de H₂SO₄ (0.3 N). As concentrações de MPO foram determinadas imediatamente com referência a curva-padrão utilizando o leitor de microplacas *Synergy H1* com controle e *software* de leitura dos dados BioTek's Gen5™ (BioTek

Instruments, Inc., Winooski, Vermont, EUA), em comprimento de onda de 450 nm. O resultado final foi corrigido para diluição inicial da amostra.

4.3.1.3.4 Biomarcadores Imunológicos

4.3.1.3.4.1 Contagem de células T CD4⁺ e T CD8⁺

Os parâmetros imunológicos referentes à contagem absoluta e percentual de células T CD4⁺ e T CD8⁺ foram obtidos por citometria de fluxo utilizando o protocolo padrão BD Multitest CD3/CD4/CD8/CD45, com tubos TruCOUNT, no citômetro de fluxo FACSCalibur[®] e *software* MultiSET (Becton Dickinson-Biociences, San Jose, Califórnia, USA). O reagente Multitest contém uma mistura dos anticorpos anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 e anti-CD45, sendo que cada um desses anticorpos está conjugado com um fluorocromo diferente: FITC, APC, PE e PerCP; respectivamente. Nos tubos TruCOUNT, há um *pellet* embaixo de uma grade ao fundo do tubo, composto de milhares de microesferas feitas de poliestireno, as chamadas *beads*. O número de *beads* que compõem o *pellet* está definido no kit dos tubos TruCOUNT e serve para que o *software* MultiSET consiga calcular o volume de sangue que passou pela célula de fluxo, gerando as contagens absolutas.

Antes da rotina ser iniciada foi realizada a calibração do citômetro; sendo avaliado o teste de sensibilidade, a corrente e potência do laser azul, voltagens dos detectores, *threshold* e valores de compensação.

O primeiro passo do preparo das amostras foi a adição de 20 µL do reagente Multitest aos tubos TruCOUNT. Imediatamente após a adição do Multitest, foi realizada a pipetagem reversa de 50 µL de sangue total, agitado os tubos no vórtex e incubação por 15 minutos à temperatura ambiente e no escuro. Após os 15 minutos de incubação dos anticorpos com as células, isto é, do Multites com o sangue, foi acrescentado 450 µL da solução de lise (FACSLsing Solution, Becton Dickinson-Biociences, San Jose, Califórnia, USA) já diluída 1:10 com água destilada antes do uso da rotina CD4/CD8. Depois desse procedimento, o tubo foi novamente agitado no vórtex e realizado uma nova incubação de 15 minutos à temperatura ambiente e no escuro. A incubação da mistura de sangue e anticorpos com a solução de lise tem como objetivos: i) destruir (lisar) os eritrócitos, os quais podem interferir na dispersão de luz e formar aglomerados potencialmente problemáticos para o citômetro e ii) fixar os leucócitos marcados, estabilizando a reação.

Ao mesmo tempo, foi realizado o controle de qualidade dos tubos TruCOUNT e do preparo das amostras utilizando sangue de paciente não infectado pelo HIV coletado em tudo de EDTA K2. Foram preparados três tubos de controle: alto, médio e baixo; seguindo o mesmo preparo que as amostras como citado acima, mas com um último passo a mais. Após a incubação com a solução de lise diluída, foi acrescentado ao tubo controle alto 50 µL das *beads* TruCOUNT Control High; ao controle médio 50 µL das *beads* TruCOUNT Control Medium; e ao controle baixo, 50 µL das *beads* TruCOUNT Control Low. Os tubos dos controles foram agitados e a leitura realizada imediatamente. Em seguida, as amostras foram processadas no FACSCalibur. Após a leitura de cada amostra, o MultiSET gera os resultados com as contagens percentuais e absolutas, bem como a razão CD4/CD8.

4.3.1.3.5 Biomarcador Viroológico

4.3.1.3.5.1 *Reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa (RT-PCR) para quantificação dos níveis plasmáticos de RNA do HIV*

A carga viral plasmática foi quantificada em sistema automatizado Abbott m2000 RealTime HIV1 pela reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa (RT-PCR) (Abbott Laboratories, Chicago, Illinois, EUA). O sistema m2000 consiste de dois instrumentos: o m2000sp (extração automatizada) e o instrumento m2000rt (PCR em tempo real), que amplifica e detecta o ácido nucléico do HIV-1 usando um único DNA linear de cadeia dupla. O RNA foi extraído a partir de 0,6 mL de plasma utilizando a tecnologia de micropartículas magnéticas, com limite de detecção inferior de 40 cópias/mL e superior de quantificação de 10.000.000 cópias/mL. O RNA foi isolado e adicionado manualmente à mistura principal preparada, seguida pela amplificação por PCR em tempo real. A transcrição reversa, a amplificação por PCR e as reações de detecção/quantificação foram realizadas na plataforma Abbott m2000rt. Durante a reação de amplificação, o RNA-alvo foi convertido em cDNA pela atividade de transcriptase reversa da enzima termoestável rTth DNA polimerase. A quantidade da sequência-alvo de HIV-1 presente em cada ciclo de amplificação foi medida com o uso de sondas de oligonucleotídeos marcados por fluorescência no sistema m2000rtTM. A sonda consiste em dois fragmentos de DNA de comprimentos diferentes: o fragmento mais longo é complementar ao DNA alvo e é ligado a um marcador fluorescente, enquanto que o fragmento mais curto contém a molécula de desativação. Quando o DNA alvo não está presente, a sonda longa liga-se à sonda de desativação e não é detectada fluorescência. Porém, quando o DNA

alvo está presente, a sonda longa se liga preferencialmente ao DNA alvo e é capaz de fluorescer dando um sinal quantificável. A concentração de RNA do HIV-1 em amostras foi calculada a partir da curva de calibração armazenada e os resultados foram reportados automaticamente na estação de trabalho m2000rt. Os resultados do ensaio foram relatados em cópias/mL (cp/mL) e $\log_{10}$ cp/mL.

4.3.1.4 Avaliação estatística

Na análise estatística, foi verificada a normalidade dos dados pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov*. Os valores de LPS, sCD14, PCR-us e MPO não apresentaram distribuição normal. Portanto, as variáveis contínuas foram descritas por meio de mediana e intervalo interquartilico, e as variáveis categóricas por meio de número e percentual. As possíveis diferenças entre os grupos para as variáveis contínuas foram avaliadas pelos testes de *Kruskal-Wallis* (i.e. três ou mais grupos) ou *Mann-Whitney* (i.e. dois grupos); enquanto, as variáveis categóricas foram avaliadas pelo Qui-Quadrado (χ^2) ou Exato de Fisher (frequências abaixo de cinco), conforme apropriado. O tempo de infecção pelo HIV foi categorizado em Quartis: 1º Quartil, < 3,0 anos; 2º Quartil, 3,0 – 8,0 anos; 3º Quartil, 9,0 – 13,0 anos e 4º Quartil > 13,0 anos. As possíveis correlações entre os biomarcadores foram evidenciadas pela correlação de *Spearman*. O programa estatístico empregado foi SPSS 20.0® (Chicago, EUA), independentemente do teste utilizado o nível de significância foi fixado em $p < 0,05$.

4.3.2 Resultados e Discussão

Foram selecionados para pesquisa 78 indivíduos infectados pelo HIV, a caracterização da população da pesquisa está apresentada na Tabela 1. A maior parte dos infectados pelo HIV avaliados no estudo são do sexo masculino, com idade média de 46 ± 11 anos, apresentam contagem de células T CD4+ superior a 500 células/mL, inversão da relação CD4/CD8 e carga viral indetectável (Tabela 3).

Com relação ao tratamento, segundo protocolo do Ministério da Saúde a terapia inicial deve sempre incluir combinações de três antirretrovirais, sendo dois inibidores da transcriptase reversa análogo de nucleosídeos e nucleotídeos (ITRN/ITRNt) associados a uma outra classe de antirretrovirais: inibidores da transcriptase reversa não análogo de nucleosídeos (ITRNN), inibidor de protease com reforço de ritonavir (IP/r) ou inibidor de integrase (INI) (BRASIL,

2018). Os esquemas terapêuticos utilizados pelos indivíduos do estudo estão apresentados na Tabela 3.

No Brasil, para os casos em início de tratamento, o esquema inicial preferencial deve ser a associação de dois ITRN/ITRNt – lamivudina (3TC) e tenofovir (TDF) – associados ao inibidor de integrase (INI) – dolutegravir (DTG) (BRASIL, 2018), sendo que, no presente estudo, 26% dos indivíduos infectados pelo HIV utilizam esse esquema terapêutico. Contudo, 37% dos participantes do estudo são tratados com 2 ITRN/ITRNts + 1 IP/r, enquanto outros 37% dos indivíduos são tratados com 2 ITRN/ITRNts + 1 INI (Tabela 3). Esta divergência de esquemas terapêuticos em relação ao esquema preferencial preconizado se deve a situações especiais de intolerância ou contraindicação (coinfecção por tuberculose, mulheres com possibilidade de engravidar e gestantes), com adequação dos antirretrovirais para os esquemas iniciais alternativos (BRASIL, 2018).

Tabela 3 - Caracterização dos indivíduos infectados pelo HIV avaliados no estudo

Características	Indivíduos infectados pelo HIV (n=78)
Idade (anos)	46 ± 11
Sexo, n (%)	
<i>Masculino</i>	44 (56)
<i>Feminino</i>	34 (44)
Tempo de infecção pelo HIV (anos)	8,54 ± 6,06
CD4+ (células/mm ³)	542 ± 329
CD8 + (células/mm ³)	1060 ± 462
Percentual de linfócitos T CD4+	24,05 ± 10,60
Percentual de linfócitos T CD8 +	48,64 ± 13,46
Relação CD4/CD8, n (%)	
<i>Com Inversão</i>	71 (91)
<i>Sem Inversão</i>	7 (9)
Carga viral, n (%)	
<i>Indetectável</i>	59 (76)
<i>Detectável</i>	19 (24)
Tempo de TARV (anos)	8,17 ± 5,94
Antirretrovirais, n (%)	
2 ITRN/ITRNts + 1 ITRNN	
Tenofovir (TDF) + Lamivudine (3TC) + Efavirenz (EFV)	25 (32)
Zidovudine (AZT, ZDV) + Lamivudine (3TC) + Efavirenz (EFV)	3 (4)
Abacavir (ABC) + Lamivudine (3TC) + Efavirenz (EFV)	1 (1)
2 ITRN/ITRNts + 1 IP/r	
Tenofovir (TDF) + Lamivudine (3TC) + Atazanavir (ATV) + Ritonavir (RTV)	21 (27)
Tenofovir (TDF) + Lamivudine (3TC) + Darunavir (DRV) + Ritonavir (RTV)	5 (6)
Zidovudine (AZT, ZDV) + Lamivudine (3TC) + Atazanavir (ATV) + Ritonavir (RTV)	2 (3)
Zidovudine (AZT, ZDV) + Lamivudine (3TC) + Darunavir (DRV) + Ritonavir (RTV)	1 (1)
2 ITRN/ITRNts + 1 INI	
Tenofovir (TDF) + Lamivudine (3TC) + Dolutegravir (DTG)	20 (26)

Valores apresentados em média ± desvio-padrão, número e percentual.

TARV, terapia antirretroviral; ITRN/ITRNt, inibidores da transcriptase reversa análogo de nucleosídeos e nucleotídeos; ITRNN, inibidores da transcriptase reversa não análogo de nucleosídeos; IP/r, inibidor de protease com reforço de ritonavir; INI, inibidor de integrase. Fonte: A autora

Risco cardiovascular

Os biomarcadores de translocação microbiana (LPS), ativação imune à produtos bacterianos (LBP), ativação de monócitos/macrófagos (sCD14), inflamação e risco cardiovascular (MPO) foram avaliados de acordo com diferentes níveis plasmáticos do biomarcador PCR-us, dos indivíduos infectados pelo HIV, para potencial aumento do risco do desenvolvimento de DCV (Tabela 4). A PCR-us é, atualmente, o melhor biomarcador inflamatório validado em termos de predição de risco cardiovascular e sua avaliação pode identificar em longo prazo uma proporção substancial de indivíduos com maior risco absoluto, quando comparada com os escores de risco convencionais (JOHNS et al., 2018).

A PCR-us em indivíduos infectados pelo HIV está associada a fatores de risco cardiovasculares tradicionais, principalmente em pacientes tratados com TARV (DE LUCA et al., 2013; GUIMARÃES et al., 2008). Triant et al. (2009) demonstraram que a PCR-us elevada em indivíduos infectados pelo HIV está associada, de forma independente, ao aumento do risco relativo de infarto agudo do miocárdio (TRIAN; MEIGS; GRINSPOON, 2009). Portanto, a avaliação da PCR-us pode ser utilizada na avaliação do risco cardiovascular em indivíduos infectados pelo HIV (TRIAN; MEIGS; GRINSPOON, 2009).

O presente estudo não encontrou diferença estatística com relação a idade, sexo, tempo de infecção, tempo de utilização dos antirretrovirais, contagem de células T CD4+ e carga viral entre os grupos avaliados, demonstrando homogeneidade da população do estudo (Tabela 4).

Os níveis de endotoxinas plasmáticas foram inferiores 1,0 EU/mL na maioria dos indivíduos infectados pelo HIV, com valores medianos de 0,125 EU/mL (Tabela 4). Esses resultados estão de acordo com os níveis plasmáticos normais de LPS encontrados na população geral, caracterizada com taxas de endotoxinas inferiores a 1,0 EU/mL, com valores médios de 0,128 EU/mL (NÁDHÁZI et al., 2002).

Deve ser levado em consideração que a associação dos níveis de endotoxinas plasmáticas com marcadores inflamatórios tem sido inconsistente na literatura (HAISSMAN et al., 2017; KELESIDIS et al., 2012; SANDLER et al., 2011; VAN DEN DRIES et al., 2015), uma vez que o grau de resposta do hospedeiro na neutralização de LPS ocorre de forma individual (LICHTFUSS et al., 2011). Ao mesmo tempo, a heterogeneidade na estrutura, solubilidade, estado físico e bioatividade do LPS colocam limitações importantes na interpretação dos testes de endotoxina plasmática (MUNFORD, 2016).

Não houve diferença entre os níveis plasmáticos de LBP de acordo com os grupos do estudo (Tabela 4). A LBP é uma molécula versátil apresentando diferentes funções na regulação imune e na transferência lipídica. As respostas celulares aos LPS são potencializadas pela LBP,

uma proteína que acelera a ligação de LPS ao coreceptor CD14. Além disso, a LBP copurifica com partículas de lipoproteínas de alta densidade (HDL), transferindo o LPS para essas lipoproteínas e neutralizando seus efeitos deletérios (KOPP; KUPSCH; SCHROMM, 2016). A LBP é encontrada no soro ou plasma normal nas concentrações de 5 a 10 µg/mL (TOBIAS et al., 1992), entretanto o presente estudo demonstrou valores superiores em indivíduos infectados pelo HIV (Tabela 4).

Apesar das evidências crescentes de que a LBP desempenha um papel importante na fisiopatologia das DCV (LEPPER et al., 2011), o presente estudo não encontrou relação entre as concentrações plasmáticas de LBP com os níveis mais altos de PCR-us, relacionados à potencial aumento do risco cardiovascular (Tabela 4).

No entanto, o presente estudo demonstrou aumento significativo de níveis plasmáticos de sCD14 e MPO em indivíduos com altos valores de PCR-us (Tabela 4), dois biomarcadores relacionados ao risco cardiovascular. Estudos longitudinais demonstraram associações entre os níveis de sCD14 e DCV na população geral e em indivíduos infectados pelo HIV. Um estudo recente determinou 85 biomarcadores solúveis em 3.523 participantes, demonstrando que o sCD14 prediz a insuficiência cardíaca incidente, mortalidade por todas as causas e por DCV (HO et al., 2018).

Em indivíduos infectados pelo HIV, Kelesidis et al. (2012) demonstraram que os biomarcadores LPS e sCD14 predizem a progressão da aterosclerose subclínica, ao longo de um período de 3 anos (KELESIDIS et al., 2012). Hanna et al. (2017) constataram que os níveis sCD14 foram significativamente associados com a formação de nova placa da artéria carótida após 7 anos, demonstrando que os níveis de sCD14 desempenham papel significativo no desenvolvimento da aterosclerose entre indivíduos infectados pelo HIV (HANNA et al., 2017). Em contraste, um estudo transversal desenvolvido por Longenecker et al. (2014) não encontrou associação dos níveis de sCD14 com espessura da camada íntima-média da artéria carótida comum ou com a placa aterosclerótica (LONGENECKER; TRIANT, 2014). Porém, esse estudo destaca a necessidade do acompanhamento longitudinal para esclarecer os efeitos deletérios da ativação imunológica crônica e da inflamação na doença cardiovascular (LONGENECKER; TRIANT, 2014).

Com relação a associação dos altos níveis de PCR-us com o aumento da MPO (Tabela 4), deve ser levado em consideração que a MPO é um biomarcador de inflamação e risco cardiovascular particularmente útil em populações de alto risco (SCHINDHELM et al., 2009). Desta forma, os biomarcadores analisados no estudo também foram avaliados de acordo com o

cutoff da MPO em indivíduos infectados pelo HIV, para potencial aumento do risco do desenvolvimento de DCV (Tabela 5).

Vários estudos demonstraram associações entre os níveis de MPO e DCV na população geral e em infectados pelo HIV. Um estudo caso-controle com 158 indivíduos, apresentando doença arterial coronariana estabelecida e 175 controles, demonstrou que a atividade de MPO foi significativamente maior para os casos de doença do que para os controles (ZHANG et al., 2001). Baldus et al. (2003) avaliaram 1.090 pacientes com síndromes coronarianas agudas, durante 6 meses de acompanhamento e demonstraram que os níveis séricos de MPO podem prever um risco aumentado para eventos cardiovasculares subsequentes e ampliar as informações prognósticas obtidas dos marcadores bioquímicos tradicionais (BALDUS et al., 2003). Meuwese et al. (2007) demonstraram a associação entre MPO e DCV, avaliando 1.138 indivíduos com doença arterial coronariana estabelecida e 2.237 controles, sendo que o quartil superior da MPO versus o quartil inferior estava relacionado para doença arterial coronariana após ajuste para fatores de risco tradicionais (MEUWESE et al., 2007).

Outro estudo desenvolvido por Scharnagl et al. (2014) com 3.036 participantes, durante um tempo médio de 7,75 anos, demonstrou que as concentrações de MPO estão independentemente associadas ao risco de mortalidade geral e cardiovascular em pacientes com doença arterial coronariana (SCHARNAGL et al., 2014). Kacprzak e Zielinska (2016) demonstraram que a MPO é um marcador prognóstico em pacientes com infarto agudo do miocárdio com supradesnivelamento do segmento ST tratados com intervenção coronária percutânea primária (KACPRZAK; ZIELINSKA, 2016). Em 2018, Mayyas et al. demonstraram que altos níveis plasmáticos de MPO estão associados a um risco aumentado de doença cardiovascular aterosclerótica (MAYYAS et al., 2018). Ross et al. (2009) verificaram a associação entre as concentrações de MPO plasmáticas e a espessura das camadas íntima e média da artéria carótida em indivíduos infectados pelo HIV (ROSS et al., 2009).

Todos os estudos mencionados acima relataram associações significativas entre MPO e DCV, em contraste um estudo caso-controle com indivíduos infectados pelo HIV não mostrou associação significativa independente da MPO com eventos cardiovasculares (EL-BEJJANI et al., 2008). Porém, deve ser ressaltado que esse estudo determinou os níveis de MPO em plasmas armazenados nos 6-12 meses que precederam os eventos cardiovasculares (EL-BEJJANI et al., 2008). Outro estudo, em pacientes submetidos a angiografia coronariana eletiva, não foram observadas diferenças significativas nas concentrações de MPO dos indivíduos com doença arterial coronariana estável em comparação com aqueles sem comprovação, sugerindo que a

liberação sistêmica de MPO não é uma característica da doença arterial coronariana assintomática (KUBALA et al., 2008). Uma possível explicação para esses resultados pode ser o menor risco da doença arterial coronariana estável versus a instável (SCHINDHELM et al., 2009). Pois, eventos cardiovasculares são mais prováveis em DCV instáveis; tais observações podem indicar que a MPO é particularmente biomarcador útil em populações de alto risco (SCHINDHELM et al., 2009).

No presente estudo, valores acima de 350 ng/mL de MPO apresentaram diminuição significativa da contagem de células T CD4⁺ e aumento significativo de PCR-us (Tabela 5). Existem fortes evidências da associação entre a depleção periférica de células T CD4⁺ e o risco aumentado de um evento cardiovascular (KAPLAN et al., 2008; LICHTENSTEIN et al., 2010). No entanto, não houve diferença estatística para os biomarcadores de translocação microbiana, ativação imune à produtos bacterianos e ativação de monócitos/macrófagos (Tabela 5). Porém, deve ser ressaltado uma tendência para aumento significativo ($p=0,076$) dos níveis plasmáticos sCD14 no grupo com MPO superior a 350 ng/mL (Tabela 5).

Tabela 4 – Caracterização dos indivíduos infectados pelo HIV e avaliação dos biomarcadores de acordo com os níveis plasmáticos de PCR-us

Parâmetros	PCR-us ≤ 3,0 mg/L 1,2 (0,6 – 1,9) (n=50)	PCR-us >3,0 mg/L 6,4 (4,4 – 8,2) (n=28)	Valor de <i>p</i>
Idade (anos) ^a	46 (40 – 52)	44 (35 – 54)	0,401
Sexo, n (%) ^b			
Masculino	29 (58)	15 (54)	0,888
Feminino	21 (42)	13 (46)	
Tempo de infecção (anos) ^a	7,0 (2,0 – 12,0)	8,0 (5,0 – 15,0)	0,176
Tempo de TARV (anos) ^a	6,0 (2,0 – 11,0)	8,0 (5,0 – 15,0)	0,335
CD4+ (células/mm ³) ^a	585 (226 – 960)	438 (234 – 790)	0,636
Carga viral, n (%) ^c			
Indetectável	35 (70)	24 (86)	0,171
Detectável	15 (30)	4 (14)	
Biomarcadores			
LPS, n (%) ^a	0,125 (0,125 – 0,260)	0,125 (0,125 – 0,512)	0,347
LPS, n (%) ^b			
≤ 1,0 EU/mL	43 (86)	22 (79)	0,598
> 1,0 EU/mL	7 (14)	6 (21)	
LBP (µg/mL) ^a	62,21 (54,91 – 71,74)	58,87 (42,24 – 71,52)	0,235
sCD14 (µg/mL) ^a	1,97 (1,58 – 2,17)	2,20 (2,03 – 2,36)	0,003*
MPO (ng/mL) ^a	238 (202 – 288)	287 (234 – 382)	0,015*

^aTeste de *Mann-Whitney*, mediana e amplitude interquartil (25ºQuartil - 75ºQuartil);

^bQui-Quadrado (χ^2), número e percentual (%)

^cTeste Exato de Fisher, número e percentual (%);

*diferença estatística entre os grupos;

TARV, terapia antirretroviral; LPS, lipopolissacarídeos; LBP, Proteína de ligação a LPS (do inglês *LPS binding protein*); sCD14, CD14 solúvel; MPO, Mieloperoxidase; PCR-us, Proteína C Reativa-ultra sensível.
Fonte: A autora

Tabela 5 - Caracterização dos indivíduos infectados pelo HIV e avaliação dos biomarcadores de acordo com os níveis plasmáticos de MPO

Parâmetros	MPO <350 ng/mL 238 (198 – 286) (n=66)	MPO ≥350 ng/mL 495 (366 – 550) (n=12)	Valor de <i>p</i>
Idade (anos) ^a	46 (39 – 53)	41 (35 – 53)	0,256
Sexo, n (%) ^b			
Masculino	40 (61)	4 (33)	0,114
Feminino	26 (39)	8 (67)	
Tempo de infecção (anos) ^a	8,0 (3,0 – 15,0)	8,0 (1,5 – 9,0)	0,229
Tempo de TARV (anos) ^a	8,0 (3,0 – 15,0)	8,0 (1,5 – 9,0)	0,335
CD4+ (células/mm ³) ^a	572 (233 – 813)	350 (108 – 444)	0,032*
Carga viral, n (%) ^b			
Indetectável	51 (77)	8 (33)	0,472
Detectável	15 (23)	4 (67)	
Biomarcadores			
LPS, n (%) ^a	0,125 (0,125 – 0,287)	0,140 (0,125 – 0,394)	0,402
LPS, n (%) ^b			
≤ 1,0 EU/mL	55 (83)	10 (83)	0,682
> 1,0 EU/mL	11 (17)	2 (17)	
LBP (µg/mL) ^a	61,69 (54,58 – 71,83)	54,50 (45,08 – 68,37)	0,111
sCD14 (µg/mL) ^a	2,05 (1,71 – 2,22)	2,20 (1,89 – 2,57)	0,076
PCR-us (mg/L) ^a	1,7 (0,7 – 4,1)	4,4 (2,2 – 30,1)	0,003*

^aTeste de *Mann-Whitney*, mediana e amplitude interquartil (25ºQuartil - 75ºQuartil);

^bTeste Exato de Fisher, número e percentual (%);

*diferença estatística entre os grupos;

TARV, terapia antirretroviral; LPS, lipopolissacarídeos; LBP, Proteína de ligação a LPS (do inglês *LPS binding protein*); sCD14, CD14 solúvel; MPO, Mieloperoxidase; PCR-us, Proteína C Reativa-ultra sensível.

Fonte: A autora

Estado imunológico

A avaliação dos biomarcadores de acordo com o estado imunológico dos indivíduos infectados pelo HIV, detectados pelos níveis de contagem de células T CD4+ está apresentada na Tabela 6. O grupo com contagem de linfócitos T CD4+ inferior a 500 células/mL apresentou o maior número de indivíduos com carga viral detectável, diminuição significativa dos níveis plasmáticos do biomarcador LBP e aumento significativo dos valores de PCR-us (Tabela 6).

Uma análise transversal de duas grandes coortes de indivíduos infectados e não infectados pelo HIV, demonstrou prevalência aumentada de aterosclerose subclínica em indivíduos infectados pelo HIV, particularmente naqueles com contagens de CD4+ inferior a 200 células/mm³ (KAPLAN et al., 2008). Outro estudo desenvolvido por Lichtenstein et al. (2010) demonstrou que indivíduos com contagem inferior a 500 células/mm³ apresentam-se mais predispostos a um evento cardiovascular (LICHTENSTEIN et al., 2010). Além dos fatores tradicionais de risco para doenças cardiovasculares, a diminuição da contagem de células T CD4+ é o fator de risco mais importante para o aumento da aterosclerose subclínica em indivíduos infectados pelo HIV (KAPLAN et al., 2008).

A diminuição significativa de LBP para os indivíduos com baixa contagem de linfócitos T CD4+ (Tabela 6), pode ser explicado pelo duplo papel da LBP, tanto potencializando quanto diminuindo as respostas celulares ao LPS bacteriano. Enquanto concentrações baixas de LBP potencializam a estimulação celular por transferência de LPS para CD14, com liberação de citocinas pró-inflamatórias; altas concentrações de LBP inibem as respostas celulares ao LPS neutralizando o LPS e transferindo-o para as lipoproteínas plasmáticas (GUTSMANN et al., 2001).

Consistente com isso, estudos sugerem que a natureza protetora dos níveis elevados da HDL contra DCV pode ser, pelo menos parcialmente, atribuída à sua capacidade de eliminar o LPS da circulação, diminuindo assim a inflamação induzida por LPS, que pode acelerar a aterogênese (SUZUKI et al., 2010).

Tabela 6 - Caracterização dos indivíduos infectados pelo HIV e biomarcadores de acordo com a contagem absoluta de células T CD4+

Parâmetros	CD4+ <500 células/mm ³ 225 (149 – 361) (n=36)	CD4+ ≥500 células/mm ³ 758 (595 – 918) (n=42)	Valor de <i>p</i>
Idade (anos) ^a	46 (39 – 53)	44 (37 – 53)	0,814
Sexo, n (%) ^b			
Masculino	20 (56)	24 (57)	0,930
Feminino	16 (44)	18 (43)	
Tempo de infecção (anos) ^a	8,0 (2,0 – 10,5)	9,0 (3,0 – 15,2)	0,135
Tempo de TARV (anos) ^a	8,0 (2,0 – 10,5)	7,5 (3,0 – 15,2)	0,266
Carga viral, n (%) ^c			
Indetectável	22 (61)	37 (88)	0,008*
Detectável	14 (39)	5 (12)	
Biomarcadores			
LPS, n (%) ^a	0,125 (0,125 – 0,394)	0,125 (0,125 – 0,248)	0,841
LPS, n (%) ^b			
≤ 1,0 EU/mL	30 (83)	35 (83)	1,000
> 1,0 EU/mL	6 (17)	7 (17)	
LBP (µg/mL) ^a	55,89 (46,69 – 65,00)	67,34 (58,31 – 76,34)	0,001*
sCD14 (µg/mL) ^a	2,09 (1,87 – 2,30)	2,03 (1,56 – 2,20)	0,170
MPO (µg/mL) ^a	268 (215 – 359)	248 (202 – 289)	0,103
PCR-us (mg/L) ^a	2,3 (1,3 – 6,6)	1,4 (0,6 – 4,1)	0,017*

^aTeste de *Mann-Whitney*, mediana e amplitude interquartil (25ºQuartil - 75ºQuartil);

^bQui-Quadrado (χ^2), número e percentual (%)

^cTeste Exato de Fisher, número e percentual (%);

*diferença estatística entre os grupos;

TARV, terapia antirretroviral; LPS, lipopolissacarídeos; LBP, Proteína de ligação a LPS (do inglês *LPS binding protein*); sCD14, CD14 solúvel; MPO, Mieloperoxidase; PCR-us, Proteína C Reativa-ultra sensível.

Fonte: A autora

Esquema terapêutico

Os biomarcadores também foram avaliados de acordo com o esquema terapêutico utilizado pelos indivíduos infectados pelo HIV (Tabela 7). Observou-se menor tempo de infecção e tempo de utilização de antirretrovirais no grupo 2 ITRN/ITRNts + 1 INI. Tal dado já é esperado pois este esquema terapêutico é indicado no início do tratamento, quando é utilizada a associação de lamivudina (3TC) e tenofovir (TDF) com dolutegravir (DTG) (BRASIL, 2018).

Não houve interferência da TARV em nenhum dos biomarcadores avaliados neste estudo (Tabela 7). Tais resultados corroboram aos encontrados por Villanueva-Millán et al. (2017), que não demonstraram alterações nas concentrações plasmáticas de sCD14 e LBP (VILLANUEVA-MILLÁN et al., 2017), entre os mesmos grupos de antirretrovirais avaliados no presente estudo. Em outro estudo transversal, também não se demonstrou diferença significativa ($p=0,236$) nos níveis de sCD14 entre a terapia baseada no efavirenz e a terapia baseada em inibidores de protease com reforço de ritonavir (PINTO-CARDOSO et al., 2017).

Tempo de infecção

A influência do tempo de infecção pelo HIV nos biomarcadores avaliados no estudo está apresentada na Tabela 8. Não houve alteração nos níveis plasmáticos dos biomarcadores de translocação microbiana, ativação imune a produtos bacterianos, ativação de monócitos/macrófagos, inflamação e risco cardiovascular na população do estudo (Tabela 8). Observou-se que o tempo de utilização da TARV acompanhou o tempo de infecção pelo HIV (Tabela 8).

Tabela 7 - Caracterização dos indivíduos infectados pelo HIV e biomarcadores de acordo com o esquema terapêutico

Parâmetros	2 ITRN/ITRNts 1 ITRNN (n=29)	2 ITRN/ITRNts 1 IP/r (n=29)	2 ITRN/ITRNts 1 INI (n=20)	Valor de p
Idade (anos) ^a	43 (35 – 51)	50 (41 – 58)	46 (39 – 55)	0,106
Sexo, n (%) ^b				
<i>Masculino</i>	16 (55)	15 (52)	13 (65)	0,645
<i>Feminino</i>	13 (45)	14 (48)	7 (35)	
Tempo de infecção (anos) ^a	8,0 (3,5 – 11,5)	9,0 (6,5 – 15,0)	2,0 (2,0 – 11,5)*†	0,015
Tempo de TARV (anos) ^a	7,0 (3,0 – 10,0)	9,0 (6,5 – 15,0)	2,0 (2,0 – 10,2)*†	0,008
CD4+ (células/mm ³) ^a	597 (398 – 808)	427 (226 – 682)	380 (176 – 889)	0,261
Carga viral, n (%) ^c				
<i>Indetectável</i>	22 (76)	19 (66)	18 (90)	>0,146
<i>Detectável</i>	7 (24)	10 (34)	2 (10)	
<i>Biomarcadores</i>				
LPS, n (%) ^a	0,125 (0,125 – 0,233)	0,125 (0,125 – 0,951)	0,125 (0,125 – 0,394)	0,975
LPS, n (%) ^c				
<i>≤ 1,0 EU/mL</i>	26 (90)	22 (76)	17 (85)	>0,361
<i>> 1,0 EU/mL</i>	3 (10)	7 (24)	3 (35)	
LBP (µg/mL) ^a	64,39 (54,32 – 73,20)	58,48 (49,46 – 68,87)	62,22 (56,93 – 68,63)	0,461
sCD14 (µg/mL) ^a	2,04 (1,85 – 2,32)	2,02 (1,71 – 2,26)	2,09 (1,76 – 2,20)	0,902
MPO (µg/mL) ^a	267 (211 – 336)	259 (218 – 310)	244 (198 – 289)	0,626
PCR-us (mg/L) ^a	1,9 (0,95 – 7,1)	2,0 (0,8 – 4,6)	1,6 (0,6 – 2,6)	0,527

^aTeste de *Kruskal-Wallis*, mediana e amplitude interquartil (25ºQuartil - 75ºQuartil);

^bQui-Quadrado (χ^2), número e percentual (%)

^cTeste Exato de Fisher, número e percentual (%);

*diferença estatística com relação ao grupo 2 ITRN/ITRNts + 1 ITRNN;

† diferença estatística com relação ao grupo 2 ITRN/ITRNts + 1 IP/r;

TARV, terapia antirretroviral; ITRN/ITRNt, inibidores da transcriptase reversa análogo de nucleosídeos e nucleotídeos; ITRNN, inibidores da transcriptase reversa não análogo de nucleosídeos; IP/r, inibidor de protease com reforço de ritonavir; INI, inibidor de integrase. LPS, lipopolissacarídeos; LBP, Proteína de ligação a LPS (do inglês LPS *binding protein*); sCD14, CD14 solúvel; MPO, Mieloperoxidase; PCR-us, Proteína C Reativa-ultra sensível.

Fonte: A autora

Tabela 8 - Caracterização dos indivíduos infectados pelo HIV e biomarcadores de acordo com o tempo de infecção pelo HIV

Parâmetros	Tempo de infecção pelo HIV				Valor de <i>p</i>
	<3,0 anos 2,0 (1,0 – 2,0) (n=16)	3,0 – 7,0 anos 4,5 (3,0 – 7,0) (n=20)	8,0 – 13,0 anos 9,0 (8,0 – 13,0) (n=23)	>13,0 anos 18,0 (15,0 – 19,0) (n=19)	
Idade (anos) ^a	44 (36 – 54)	44 (36 – 54)	45 (35 – 52)	50 (41 – 57)	0,563
Sexo, n (%) ^b					
<i>Masculino</i>	9 (56)	12 (60)	15 (65)	8 (42)	0,492
<i>Feminino</i>	7 (44)	8 (40)	8 (35)	11 (58)	
Tempo de TARV (anos) ^a	2,0 (1,0 – 2,0)	4,5 (3,0 – 6,0)	9,0 (8,0 -9,0)	17,0 (15,0 – 18,0)*†‡	<0,001
CD4 ⁺ (células/mm ³) ^a	302 (117 – 698)	625 (267 – 910)	472 (281 – 649)	582 (236 – 816)	0,203
Carga viral, n (%) ^c					
<i>Indetectável</i>	11 (69)	15 (75)	18 (78)	15 (79)	>0,893
<i>Detectável</i>	5 (31)	5 (25)	5 (22)	4 (21)	
Biomarcadores					
LPS, EU/mL ^a	0,125 (0,125 – 0,344)	0,140 (0,125 – 0,844)	0,125 (0,125 – 0,217)	0,125 (0,125 – 0,258)	0,656
LPS, EU/mL ^c					
≤ 1,0 EU/mL	14 (88)	16 (80)	20 (87)	15 (79)	>0,849
> 1,0 EU/mL	2 (12)	4 (20)	3 (13)	4 (21)	
LBP (µg/mL) ^a	60,09 (56,68 – 67,65)	62,68 (52,36 – 71,49)	61,43 (54,44 – 76,10)	64,64 (50,01 – 72,91)	0,996
sCD14 (µg/mL) ^a	2,02 (1,62 – 2,20)	2,04 (1,75 – 2,22)	2,06 (1,68 – 2,37)	2,08 (1,88 – 2,26)	0,781
MPO (µg/mL) ^a	268 (215 – 347)	225 (191 – 268)	286 (242 – 360)	238 (214 – 293)	0,059
PCR-us (mg/L)	1,2 (0,6 – 2,2)	2,1 (0,6 – 6,8)	1,8 (0,6 – 4,4)	2,4 (1,4 -6,1)	0,185

^aTeste de *Kruskal-Wallis*, mediana e amplitude interquartil (25ºQuartil – 75ºQuartil);^bQui-Quadrado (χ^2), número e percentual (%)^cTeste Exato de Fisher, número e percentual (%);

*diferença estatística com relação ao relação ao grupo < 3 anos;

† diferença estatística com relação ao relação ao grupo 3 – 8 anos;

‡ diferença estatística com relação ao relação ao grupo 8 - 13 anos;

TARV, terapia antirretroviral; LPS, lipopolissacarídeos; LBP, Proteína de ligação a LPS (do inglês *LPS binding protein*); sCD14, CD14 solúvel; MPO, Mieloperoxidase; PCR-us, Proteína C Reativa-ultra sensível.

Fonte: A autora

A correlação entre os biomarcadores está apresentada na Tabela 9. Houve correlação positiva significativa ($p=0,005$) entre os níveis plasmáticos de LBP e contagem de linfócitos T CD4+ (Tabela 9). Como demonstrado previamente na revisão sistemática realizada na primeira etapa desse estudo, a PCR-us apresentou maior correlação significativa com os outros biomarcadores: i) translocação microbiana - LPS ($p=0,043$); ii) ativação imune à produtos bacterianos - LBP ($p=0,039$); iii) ativação de monócitos/macrófagos - sCD14 ($p=0,001$) e iv) inflamação e risco cardiovascular - MPO ($p=0,020$). Com relação a MPO, nosso grupo de estudos demonstrou em trabalho anterior correlação semelhante com os níveis plasmáticos de PCR-us ($r=0,210$, $p=0,032$), em indivíduos infectados pelo HIV (BORATO et al., 2012).

Tabela 9 - Correlação entre os biomarcadores plasmáticos em indivíduos infectados pelo HIV

Biomarcadores	CD4+	LPS	LBP	sCD14	MPO	PCR-us
	(células/mm ³)	(EU/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(mg/L)
CD4+ (células/mm ³)	-	$r= 0,480$	$r= 0,317^*$	$r= - 0,127$	$r= - 0,137$	$r= - 0,168$
LPS (EU/mL)		-	$r= 0,033$	$r= - 0,035$	$r= 0,139$	$r=0,229^*$
LBP (µg/mL)			-	$r= - 0,004$	$r= - 0,146$	$r= - 0,234^*$
sCD14 (µg/mL)				-	$r= - 0,138$	$r= 0,371^*$
MPO (µg/mL)					-	$r= 0,262^*$
PCR-us (mg/L)						-

Coeficiente de correlação de *Spearman*;

*correlação significativa;

LPS, lipopolissacarídeos; LBP, Proteína de ligação a LPS (do inglês *LPS binding protein*); sCD14, CD14 solúvel; MPO, Mieloperoxidase; PCR-us, Proteína C Reativa-ultra sensível.

Fonte: A autora

5 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstraram consideráveis relações entre os biomarcadores que podem ser inseridos no diagnóstico do laboratório clínico, visando a interligação entre translocação microbiana, inflamação e risco cardiovascular. A PCR-us foi o biomarcador que apresentou maior associação com os outros biomarcadores, tanto na revisão sistemática como na pesquisa quantitativa.

A pesquisa quantitativa encontrou relação entre os níveis plasmáticos mais altos de PCR-us com biomarcadores de ativação de monócitos/macrófagos (sCD14), inflamação e risco cardiovascular (MPO). Porém, os níveis plasmáticos de MPO não apresentaram nenhuma relação com os biomarcadores de translocação microbiana (diretos e indiretos). Além disso, o esquema da TARV utilizado e o tempo de infecção pelo HIV não apresentaram influência sobre os biomarcadores avaliados no estudo; enquanto que, o estado imunológico demonstrou interferência nos valores plasmáticos de LBP e PCR-us.

Deve ser ressaltado ainda, a correlação entre a PCR-us com biomarcadores de translocação microbiana (LPS), ativação imune à produtos bacterianos (LBP), ativação de monócitos/macrófagos (sCD14), inflamação e risco cardiovascular (MPO), apoiando a hipótese de interligação entre translocação microbiana, inflamação e doença cardiovascular.

Desta forma, os resultados das relações entre os biomarcadores obtidos no presente estudo podem ter potencial utilidade clínico-laboratorial. Contudo, estudos longitudinais prospectivos são necessários para inserção das relações entre os biomarcadores de translocação microbiana, inflamação e risco cardiovascular no acompanhamento laboratorial dos indivíduos infectados pelo HIV.

REFERÊNCIAS

- ABATE, W. et al. Evaluation of recombinant factor C assay for the detection of divergent lipopolysaccharide structural species and comparison with *Limulus* amoebocyte lysate-based assays and a human monocyte activity assay. **Journal of Medical Microbiology**, v. 66, n. 7, p. 888–897, 2017.
- ANCUTA, P. et al. Microbial translocation is associated with increased monocyte activation and dementia in AIDS patients. **PLoS ONE**, v. 3, n. 6, p. e2516, 25 jun. 2008.
- BAHRAMI, H. et al. Inflammatory markers associated with subclinical coronary artery disease: The multicenter AIDS cohort study. **Journal of the American Heart Association**, v. 5, n. 6, p. 1–13, 2016.
- BAKER, J. V; DUPREZ, D. Biomarkers and HIV-associated cardiovascular disease. **Current Opinion in HIV and AIDS**, v. 5, n. 6, p. 511–516, nov. 2010.
- BALDUS, S. et al. Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes. **Circulation**, v. 108, n. 12, p. 1440–1445, 23 set. 2003.
- BANG, F. B. A bacterial disease of *Limulus polyphemus*. **Bulletin of the Johns Hopkins Hospital**, v. 98, n. 5, p. 325–351, maio 1956.
- BERG, R. D. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. **Trends in Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 149–154, abr. 1995.
- BERGERON, N. et al. Diets high in resistant starch increase plasma levels of trimethylamine-N-oxide, a gut microbiome metabolite associated with CVD risk. **British Journal of Nutrition**, v. 116, n. 12, p. 2020–2029, 20 dez. 2016.
- BRASIL. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. – Brasília:Ministério da Saúde, 2018.
- BRENCHLEY, J. M.; DOUEK, D. C. Microbial translocation across the GI tract. **Annual review of immunology**, v. 30, p. 149–73, 2012.
- BORATO, D. C. K. et al. Changes of metabolic and inflammatory markers in HIV infection: Glucose, lipids, serum Hs-CRP and myeloperoxidase. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 61, n. 10, p. 1353–1360, out. 2012.
- CALZA, L.; MANFREDI, R.; VERUCCHI, G. Myocardial infarction risk in HIV-infected patients: Epidemiology, pathogenesis, and clinical management. **AIDS**, v. 24, n. 6, p. 789-802, mar. 2010.
- CEBM (Centre for Evidence-Based Medicine). Oxford Centre for Evidence-based Medicine. Levels of Evidence, 2009. <http://www.cebm.net/index.aspx?o=1025> (acessado em 28 de julho de 2017).

CHACKO, S. et al. The role of biomarkers in the diagnosis and risk stratification of acute coronary syndrome. **Future science OA**, v. 4, n. 1, p. FSO251, jan. 2018.

CULLEN, P. Evidence that triglycerides are an independent coronary heart disease risk factor. **The American journal of cardiology**, v. 86, n. 9, p. 943–9, 1 nov. 2000.

CURRIER, J. S. et al. Epidemiological evidence for cardiovascular disease in HIV-infected patients and relationship to highly active antiretroviral therapy. **Circulation**, v. 118, n. 2, p. e29-35, jul. 2008.

DE LUCA, A. et al. The association of high-sensitivity c-reactive protein and other biomarkers with cardiovascular disease in patients treated for HIV: a nested case-control study. **BMC Infectious Diseases**, v. 3, n. 13, p. 414, jan. 2013.

DEMIR, O. M. et al. Cardiovascular disease burden among human immunodeficiency virus-infected individuals. **International Journal of Cardiology**, v. 265, p. 195–203, 15 ago. 2018.

DILLON, S. M.; FRANK, D. N.; WILSON, C. C. The gut microbiome and HIV-1 pathogenesis: A two-way street. **AIDS**, v. 30, n. 18, p. 2737-2751, nov. 2016.

EL-BEJJANI, D. et al. Higher plasma myeloperoxidase levels are not associated with an increased risk for cardiovascular events in HIV-infected adults. **HIV clinical trials**, v. 9, n. 3, p. 207–11, 2008.

GALVÃO-LIMA, L. J. et al. Classical and alternative macrophages have impaired function during acute and chronic HIV-1 infection. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 42–50, 2017.

GOOTENBERG, D. B. et al. HIV-associated changes in the enteric microbial community: potential role in loss of homeostasis and development of systemic inflammation. **Current opinion in infectious diseases**, v. 30, n. 1, p. 31–43, 2017.

GRINSPOON, S.; BOSTON, M. ; Novel mechanisms and anti-inflammatory strategies to reduce cardiovascular risk in human immunodeficiency virus. **Trans Am Clin Climatol Assoc**, v. 129, p. 140-154, nov. 2018.

GRINSPOON, S. K. Cardiovascular disease in HIV: Traditional and nontraditional risk factors. **Topics in antiviral medicine**, v. 22, n. 4, p. 676-679, sep. 2014.

GUIMARÃES, M. M. M. et al. High-sensitivity C-reactive protein levels in HIV-infected patients treated or not with antiretroviral drugs and their correlation with factors related to cardiovascular risk and HIV infection. **Atherosclerosis**, v. 201, n. 2, p. 434–439, 1 dez. 2008.

GUTSMANN, T. et al. Dual role of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein in neutralization of LPS and enhancement of LPS-induced activation of mononuclear cells. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 11, p. 6942–6950, nov. 2001.

HAISSMAN, J. M. et al. Microbiota-dependent metabolite and cardiovascular disease marker trimethylamine-N-oxide (TMAO) is associated with monocyte activation but not platelet function in untreated HIV infection. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, 2017.

HANNA, D. B. et al. HIV Infection Is Associated with Progression of Subclinical Carotid Atherosclerosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, n. 4, p. 640–650, 2015.

HANNA, D. B. et al. Association of macrophage inflammation biomarkers with progression of subclinical carotid artery atherosclerosis in HIV-infected women and men. **Journal of Infectious Diseases**, v. 215, n. 9, p. 1352–1361, 2017.

HO, J. E. et al. Protein biomarkers of cardiovascular disease and mortality in the community. **Journal of the American Heart Association**, v. 7, n. 14, p. 1–10, 2018.

HSUE, P. Y.; DEEKS, S. G.; HUNT, P. W. Immunologic basis of cardiovascular disease in HIV-infected adults. **Journal of Infectious Diseases**, v. 205, n. 3, p. S375–821, jun. 2012.

HSUE, P. Y.; WATERS, D. D. Time to Recognize HIV Infection as a Major Cardiovascular Risk Factor. **Circulation**, v. 138, n. 11, p. 1113–1115, 11 set. 2018.

HUNT, P. W. Th17, gut, and HIV: Therapeutic implications. **Current Opinion in HIV and AIDS**, v. 5, n. 2, p. 189–193, 2010.

Jl, Y. et al. Changes in intestinal microbiota in HIV-1-infected subjects following cART initiation: influence of CD4+ T cell count. **Emerging microbes & infections**, v. 7, n. 1, p. 113, 22 jun. 2018.

JIANG, W. et al. Plasma levels of bacterial DNA correlate with immune activation and the magnitude of immune restoration in persons with antiretroviral-treated HIV infection. **The Journal of infectious diseases**, v. 199, n. 8, p. 1177–85, 15 abr. 2009.

JOHNS, I. et al. Risk classification in primary prevention of CVD according to QRISK2 and JBS3 “heart age”, and prevalence of elevated high-sensitivity C reactive protein in the UK cohort of the EURIKA study. **Open heart**, v. 5, n. 2, p. e000849, 2018.

KACPRZAK, M.; ZIELINSKA, M. Prognostic value of myeloperoxidase concentration in patients with ST-segment elevation myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention. **International Journal of Cardiology**, v. 223, p. 452–457, 15 nov. 2016.

KAPLAN, R. C. et al. Low CD4+ T-cell count as a major atherosclerosis risk factor in HIV-infected women and men. **AIDS**, v. 22, n. 13, p. 1615–24, ago. 2008.

KARAKAS, M.; KOENIG, W. Myeloperoxidase Production by Macrophage and Risk of Atherosclerosis. **Current Atherosclerosis Reports**, v. 14, n. 3, p. 277–283, 11 jun. 2012.

KATO, Y. et al. Impact of von Willebrand factor on coronary plaque burden in coronary artery disease patients treated with statins. **Medicine**, v. 97, n. 17, p. e0589, abr. 2018.

KEARNS, A. et al. HIV-1–Associated Atherosclerosis: Unraveling the Missing Link. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 69, n. 25, p. 3084–3098, jun. 2017.

KELESIDIS, T. et al. Biomarkers of microbial translocation and macrophage activation: Association with progression of subclinical atherosclerosis in HIV-1 infection. **Journal of**

Infectious Diseases, v. 206, n. 10, p. 1558–1567, 15 nov. 2012.

KOENIG, W. et al. C-Reactive Protein Modulates Risk Prediction Based on the Framingham Score - Implications for Future Risk Assessment: Results from a Large Cohort Study in Southern Germany. **Circulation**, v. 109, n. 11, p. 1349–1353, 23 mar. 2004.

KOPP, F.; KUPSCH, S.; SCHROMM, A. B. Lipopolysaccharide-binding protein is bound and internalized by host cells and colocalizes with LPS in the cytoplasm: Implications for a role of LBP in intracellular LPS-signaling. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1863, n. 4, p. 660–672, 2016.

KUBALA, L. et al. Plasma levels of myeloperoxidase are not elevated in patients with stable coronary artery disease. **Clinica Chimica Acta**, v. 394, n. 1–2, p. 59–62, ago. 2008.

LEÓN, R. et al. Subclinical atherosclerosis in low Framingham risk HIV patients. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 47, n. 8, p. 591–599, 2017.

LEPPER, P. M. et al. Lipopolysaccharide-binding protein (LBP) is associated with total and cardiovascular mortality in individuals with or without stable coronary artery disease – Results from the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study (LURIC). **Atherosclerosis**, v. 219, n. 1, p. 291–297, nov. 2011.

LEVIN, J.; BANG, F. B. The Role of Endotoxin in the Extracellular Coagulation of Limulus Blood. **Bulletin of the Johns Hopkins Hospital**, v. 115, p. 265–74, set. 1964.

LEVIN, J.; BANG, F. B. Clottable protein in Limulus ; its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin . **Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica**, v. 19, n. 1, p. 186–197, 31 mar. 1968.

LIBERATI, A. et al. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate health care interventions: Explanation and elaboration. **PLoS Medicine**, v. 62, n. 10, p. e1-34, oct. 2009.

LICHTENSTEIN, K. A. et al. Low CD4 + T Cell Count Is a Risk Factor for Cardiovascular Disease Events in the HIV Outpatient Study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 51, n. 4, p. 435–447, 15 ago. 2010.

LICHTFUSS, G. F. et al. Biomarkers of immune dysfunction following combination antiretroviral therapy for HIV infection. **Biomarkers in Medicine**, v. 5, n. 2, p. 171–186, 2011.

LIU, J. et al. Inside Out: HIV, the Gut Microbiome, and the Mucosal Immune System. **The Journal of Immunology**, v. 198, n. 2, p. 605–614, 2017.

LONGENECKER, C. T.; TRIANT, V. A. **Initiation of antiretroviral therapy at high CD4 cell counts: Does it reduce the risk of cardiovascular disease? Current Opinion in HIV and AIDS**, v. 9, n. 1, p. 54-62, 2014.

MANNER, I. W. et al. Markers of microbial translocation predict hypertension in HIV-infected individuals. **HIV Medicine**, v. 14, n. 6, p. 354–361, jul. 2013.

MARCHETTI, G. et al. Microbial translocation predicts disease progression of HIV-infected antiretroviral-naïve patients with high CD4+cell count. **AIDS**, v. 25, n. 11, p. 1385–1394, 17 jul. 2011.

MARCHETTI, G.; TINCATI, C.; SILVESTRI, G. Microbial translocation in the pathogenesis of HIV infection and AIDS. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 1, p. 2–18, 2013.

MAY, A.; WANG, T. J. Biomarkers for cardiovascular disease: challenges and future directions. **Trends in Molecular Medicine**, v. 14, n. 6, p. 261–267, jun. 2008.

MAYYAS, F. et al. Atorvastatin Reduces Plasma Inflammatory and Oxidant Biomarkers in Patients With Risk of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. **Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics**, v. 23, n. 3, p. 216–225, maio 2018.

MENG, F.; LOWELL, C. A. Lipopolysaccharide (LPS)-induced Macrophage Activation and Signal Transduction in the Absence of Src-Family Kinases Hck, Fgr, and Lyn. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 185, n. 9, p. 1661–1670, maio 1997.

MEUWESE, M. C. et al. Serum Myeloperoxidase Levels Are Associated With the Future Risk of Coronary Artery Disease in Apparently Healthy Individuals. The EPIC-Norfolk Prospective Population Study. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 50, n. 2, p. 159–165, jul. 2007.

MUNFORD, R. S. Endotoxemia--menace, marker, or mistake? **Journal of Leukocyte Biology**, v. 100, n. 4, p. 687–698, 2016.

NÁDTHÁZI, Z. et al. Plasma endotoxin level of healthy donors. **Acta microbiologica et immunologica Hungarica**, v. 49, n. 1, p. 151–7, mar. 2002.

NAGPAL, R.; YADAV, H. Bacterial translocation from the gut to the distant organs: An overview. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 71, n. 1, p. 11-16, 2017.

NICHOLLS, S. J.; HAZEN, S. L. Myeloperoxidase, modified lipoproteins, and atherogenesis. **Journal of Lipid Research**, v. 50, n. Supplement, p. S346–S351, abr. 2009.

NOU, E.; LO, J.; GRINSPOON, S. K. Inflammation, immune activation, and cardiovascular disease in HIV. **AIDS**, v. 30, n. 10, p. 1495-509, jun. 2016.

PEDERSEN, K. K. et al. Microbial Translocation in HIV Infection Is Associated With Dyslipidemia, Insulin Resistance, and Risk of Myocardial Infarction. **JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 64, n. 5, p. 425–433, 15 dez. 2013.

PEDERSEN, K. K. et al. Monocyte activation, but not microbial translocation, is independently associated with markers of endovascular dysfunction in HIV-infected patients receiving cART. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 67, n. 4, p. 370–374, 2014.

PHILLIPS B, BALL C, SACKETT D, BADENOCH D, STRAUS S, HAYNES B, D. M. Levels of Evidence. **BJU International**, v. 103, n. 8, p. 1147–1147, 2009.

PINTO-CARDOSO, S. et al. Fecal Bacterial Communities in treated HIV infected individuals

on two antiretroviral regimens. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1–10, 2017.

PLÓCIENNIKOWSKA, A. et al. Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 3, p. 557–581, 22 fev. 2015.

REUS BANULS, S. et al. Association between inflammatory markers and microbial translocation in patients with human immunodeficiency virus infection taking antiretroviral treatment. **Medicina Clinica**, v. 142, n. 2, p. 47–52, jan. 2014.

RIDKER, P. M. et al. C-Reactive Protein and Other Markers of Inflammation in the Prediction of Cardiovascular Disease in Women. **New England Journal of Medicine**, v. 342, n. 12, p. 836–843, 23 mar. 2000.

RIDKER, P. M. et al. Comparison of C-Reactive Protein and Low-Density Lipoprotein Cholesterol Levels in the Prediction of First Cardiovascular Events. **New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 20, p. 1557–1565, 14 nov. 2002.

RIDKER, P. M. Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention. **Circulation**, v. 107, n. 3, p. 363–9, 28 jan. 2003.

ROMERO-SÁNCHEZ, M. C. et al. Different biological significance of sCD14 and LPS in HIV-infection: Importance of the immunovirology stage and association with HIV-disease progression markers. **Journal of Infection**, v. 65, n. 5, p. 431–438, nov. 2012.

ROSADO-SÁNCHEZ, I. et al. Increased frequencies of Th17 cells and IL17a-producing regulatory T-cells preceding the immunodiscordant response to antiretroviral treatment. **Journal of Infection**, v. 76, n. 1, p. 86–92, 2018.

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 : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 49, n. 7, p. 1119–27, 1 out. 2009.

SANDLER, N. G. et al. Plasma levels of soluble CD14 independently predict mortality in HIV infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 203, n. 6, p. 780–790, 2011a.

SANDLER, N. G. et al. Sevelamer does not decrease lipopolysaccharide or soluble cd14 levels but decreases soluble tissue factor, low-density lipoprotein (ldl) cholesterol, and oxidized ldl cholesterol levels in individuals with untreated hiv infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 210, n. 10, p. 1549–1554, 2014.

SANDLER, N. G.; DOUEK, D. C. Microbial translocation in HIV infection: Causes, consequences and treatment opportunities. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 9, p. 655–6613, set. 2012.

SARWAR, N. et al. Interleukin-6 receptor pathways in coronary heart disease: A collaborative meta-analysis of 82 studies. **The Lancet**, v. 379, n. 9822, p. 1205–1213, 31 mar. 2012.

SCHARNAGL, H. et al. Association of myeloperoxidase with total and cardiovascular

mortality in individuals undergoing coronary angiography - The LURIC study. **International Journal of Cardiology**, v. 174, n. 1, p. 96–105, 1 jun. 2014.

SCHINDHELM, R. K. et al. Myeloperoxidase: A useful biomarker for cardiovascular disease risk stratification? **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 8, p. 1462–70, 2009.

SHAH, A. S. V. et al. Global Burden of Atherosclerotic Cardiovascular Disease in People Living With HIV. **Circulation**, v. 138, n. 11, p. 1100–1112, 11 set. 2018.

SHAN, Z. et al. Gut Microbial-related Choline Metabolite Trimethylamine-N-oxide is Associated with Progression of Carotid Artery Atherosclerosis in HIV Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, 15 jun. 2018.

SHIVE, C. L. et al. Soluble CD14 is a nonspecific marker of monocyte activation. **AIDS**, v. 29, n. 10, p. 1263–1265, 19 jun. 2015.

SOLUM, N. O. Some characteristics of the clottable protein of limulus polyphemus blood cells. **Thrombosis et diathesis haemorrhagica**, v. 23, n. 1, p. 170–81, 28 fev. 1970.

SOLUM, N. O. The coagulogen of Limulus polyphemus hemocytes. A comparison of the clotted and non-clotted forms of the molecule. **Thrombosis Research**, v. 2, n. 1, p. 55–69, 1 jan. 1973.

STEELE, A. K. et al. Contribution of intestinal barrier damage, microbial translocation and HIV-1 infection status to an inflammaging signature. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, 2014.

SUZUKI, M. et al. High-density lipoprotein suppresses the type i interferon response, a family of potent antiviral immunoregulators, in macrophages challenged with lipopolysaccharide. **Circulation**, v. 122, n. 19, p. 1919–1927, 2010.

TENG, N. et al. The roles of myeloperoxidase in coronary artery disease and its potential implication in plaque rupture. **Redox Report**, v. 22, n. 2, p. 51–73, 4 mar. 2017.

TIMMONS, T. et al. Microbial translocation and metabolic and body composition measures in treated and untreated HIV infection. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 30, n. 3, p. 272–277, 2014.

TOBIAS, P. S. et al. Participation of lipopolysaccharide-binding protein in lipopolysaccharide-dependent macrophage activation. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 7, n. 3, p. 239–245, set. 1992.

TRIAANT, V. A. HIV infection and coronary heart disease: An intersection of epidemics. **Journal of Infectious Diseases**, v. 205, n. 3, p. S355–61, 1 jun. 2012.

TRIAANT, V. A.; MEIGS, J. B.; GRINSPOON, S. K. Association of C-reactive protein and HIV infection with acute myocardial infarction. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 51, n. 3, p. 268–273, 1 jul. 2009.

TRØSEID, M. et al. Microbial Translocation and Cardiometabolic Risk Factors in HIV Infection. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 30, n. 6, p. 514–522, jun. 2014.

VAN DEN DRIES, L. W. J. et al. von Willebrand Factor is elevated in HIV patients with a history of thrombosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 180, 2015.

VILLANUEVA-MILLÁN, M. J. et al. Differential effects of antiretrovirals on microbial translocation and gut microbiota composition of HIV-infected patients. **Journal of the International AIDS Society**, v. 20, n. 1, p. 1–13, 2017.

WHO. **Number of People (all ages) living with HIV estimates by WHO region**. Disponível em: <<http://apps.who.int/gho/data/view.main.22100WHO?lang=en>>. Acesso em: 21 nov. 2018.

WORM, S. W.; HSUE, P. Role of biomarkers in predicting CVD risk in the setting of HIV infection? **Current Opinion in HIV and AIDS**, v. 5, n. 6, p. 467–472, nov. 2010.

YOUNG, N. S.; LEVIN, J.; PRENDERGAST, R. A. An invertebrate coagulation system activated by endotoxin: evidence for enzymatic mediation. **The Journal of clinical investigation**, v. 51, n. 7, p. 1790–1797, jul. 1972.

ZANETTI, H. R. et al. Triad of the Ischemic Cardiovascular Disease in People Living with HIV? Association Between Risk Factors, HIV Infection, and Use of Antiretroviral Therapy. **Current Atherosclerosis Reports**, v. 20, n. 6, p. 30, 18 jun. 2018.

ZANONI, I.; GRANUCCI, F. Role of CD14 in host protection against infections and in metabolism regulation. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, p. 32, 2013.

ZHANG, R. et al. Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease. **JAMA**, v. 286, n. 17, p. 2136–42, 7 nov. 2001.

ANEXO A – PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DOS DADOS

PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DOS DADOS – REVISÃO SISTEMÁTICA

Título:	
Autor:	
País	
Ano de publicação	
Delineamento do estudo	
População do estudo	
Grupos do estudo	
Sexo	
Idade	
Contagem de T CD4+ (células/mm ³)	
Indivíduos em TARV (%)	
Biomarcadores Solúveis: Translocação Microbiana, Inflamação e Risco Cardiovascular	
Métodos laboratoriais	
Relações entre os biomarcadores	

ANEXO B – PARECER NÚCLEO DE EDUCAÇÃO PERMANENTE – NEP



**PREFEITURA MUNICIPAL DE PONTA GROSSA
SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE DE PONTA GROSSA
NÚCLEO DE EDUCAÇÃO PERMANENTE – NEP**

CARTA DE AUTORIZAÇÃO

Eu, CARLOS EDUARDO CORADASSI, coordenador do NEP-SMS, autorizo a realização do projeto **RELAÇÃO DOS BIOMARCADORES DA TRANSLOCAÇÃO MICROBIANA E DA ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS COM O ESTADO IMUNOLÓGICO EM INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HIV**, realizada pela Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG, que será desenvolvido pelo pesquisadora **DANIELLE CRISTYANE KALVA BORATO**.

Ressalto que qualquer publicação oriunda desta pesquisa deverá conter logo da instituição e respectiva citação.

Ponta Grossa, 12 de dezembro de 2018.

Carlos Eduardo Coradassi

Coordenador NEP-SMS-PMPG

ANEXO C – PARECER COMITE DE ÉTICA EM PESQUISA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
PONTA GROSSA - UEPG



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: INFLUÊNCIA DA TRANSLOCAÇÃO MICROBIANA NOS BIOMARCADORES DE INFLAMAÇÃO E RISCO CARDIOVASCULAR EM INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO

Pesquisador: JOSÉ CARLOS REBUGLIO VELLOSO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 56413218.0.0000.0105

Instituição Proponente: Universidade Estadual de Ponta Grossa

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.682.031

Apresentação do Projeto:

Estudo caso-controle, sendo os indivíduos infectados pelo HIV com translocação microbiana caracterizados como grupo caso, indivíduos infectados pelo HIV sem translocação microbiana e não-infectados como grupos controle. Os participantes infectados pelo HIV serão selecionados no Laboratório Municipal Alfredo Berger, Ponta Grossa, Paraná e os indivíduos não-infectados pelo HIV, do Laboratório Universitário de Análises Clínicas (LUAC) da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). As informações pessoais, os dados da história clínica dos participantes do estudo; assim como, a história atual da infecção pelo HIV, serão obtidos antecedendo a coleta de sangue. Em seguida, será determinada a pressão arterial sistêmica e realizado a avaliação corporal. No mesmo dia da coleta sanguínea serão determinados os parâmetros bioquímicos, hematológicos e imunológicos. Enquanto que, as amostras biológicas de sangue venoso utilizadas na determinação dos marcadores de translocação microbiana, marcador de ativação de monócitos e macrófagos, biomarcadores de inflamação e risco cardiovascular, citocinas e carga viral serão processadas e armazenadas de acordo com o fabricante do kit para posterior análise.

Cálculo amostral: Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 31% da população geral apresenta risco aumentado para desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Enquanto que, estudos clínicos e epidemiológicos indicam que indivíduos infectados pelo HIV apresentam

Endereço: Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748. UEPG, Campus Uvaranas, Bloco M, Sala 100.

Bairro: Uvaranas

CEP: 84.030-900

UF: PR

Município: PONTA GROSSA

Telefone: (42)3220-3108

E-mail: coep@uepg.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA - UEPG



Continuação do Parecer: 1.682.031

aproximadamente o dobro da incidência de eventos cardiovasculares quando comparados com indivíduos não infectados. Com base nestas informações, nos cálculos para um estudo caso-controle, assumindo grupos de tamanhos iguais, estimou-se que 39 indivíduos para cada grupo serão necessários para fornecer 80% de poder para o teste estatístico e para detectar uma proporção estatisticamente significativa ($\alpha = 0,05$).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Investigar as possíveis alterações, relacionadas com a translocação microbiana, sobre os níveis séricos dos biomarcadores de inflamação e risco cardiovascular em indivíduos infectados pelo HIV e sua associação com fatores tradicionais de risco.

Objetivo Secundário:

- Identificar os indivíduos infectados pelo HIV com e sem translocação microbiana;- Comparar as possíveis alterações nos biomarcadores e nos fatores de risco tradicionais para doenças cardiovasculares, entre indivíduos infectados pelo HIV com e sem translocação microbiana;
- Correlacionar o escore de risco de Framingham com os biomarcadores de inflamação e risco cardiovascular em indivíduos infectados pelo HIV com e sem translocação microbiana;
- Comparar os níveis de translocação microbiana em diferentes condições do estado imunológico (i.e. níveis plasmáticos de carga viral e contagem absoluta de linfócitos T CD4+) em indivíduos infectados pelo HIV;
- Investigar as possíveis influências da classe específica de antirretroviral em indivíduos infectados pelo HIV sobre a translocação microbiana;- Correlacionar os valores da relação MPO/PON1 com outros índices de risco cardiovascular (e.g. escore de Framingham, biomarcadores de inflamação e translocação microbiana) em infectados pelo HIV.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O participante dessa pesquisa corre risco mínimo, relacionados ao único desconforto da coleta de sangue. Esta pesquisa será realizada em conformidade com a Declaração de Helsinki. Os voluntários serão devidamente informados sobre os procedimentos e objetivos deste estudo, e após concordarem, assinarão um termo de consentimento livre e esclarecido. As coletas de sangue venoso e todos os procedimentos utilizados nesse estudo serão realizados somente após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG).

Benefícios:

Esta pesquisa proporcionará benefícios para o aprimoramento da avaliação cardiovascular de

Endereço: Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748. UEPG, Campus Uvaranas, Bloco M, Sala 100.
 Bairro: Uvaranas CEP: 84.030-900
 UF: PR Município: PONTA GROSSA
 Telefone: (42)3220-3108 E-mail: coep@uepg.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA - UEPG



Continuação do Parecer: 1.682.031

indivíduos infectados pelo HIV, uma vez que serão gerados conhecimentos sobre metabolismo, inflamação e risco cardíaco, que deverão ser utilizados no acompanhamento de populações infectadas, visando prevenção e monitorização de morbidades nestes indivíduos e, ainda será realizada a avaliação de novos biomarcadores com objetivo de detectar mudanças no perfil de risco, identificar subgrupos expostos a maior risco e estimular novas estratégias de prevenção.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Este estudo apresenta como caráter inovador a investigação da MPO, PON1 e translocação microbiana, em indivíduos infectados pelo HIV, sua associação com fatores de risco tradicionais para doenças cardiovasculares nesta população e com a classe específica de antirretroviral. Além disso, a literatura ainda não apresenta estudos com relação a determinação da razão MPO/PON1 em infectados pelo HIV.

O resultado será contribuir significativamente para o conhecimento da influência da translocação microbiana nos biomarcadores de inflamação e risco cardiovascular em indivíduos infectados pelo HIV.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de rosto: de acordo

Declarações e termos: de acordo

TCLE: de acordo

Recomendações:

ao final da pesquisa, elaborar relatório e submetê-lo via Plataforma Brasil, para evitar pendências junto à COEP e PROPESP.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

não se aplica.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_720485.pdf	21/07/2016 16:00:57		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	TCLE.pdf	21/07/2016 16:00:32	Danielle Cristyane Kalva Borato	Aceito

Endereço: Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748. UEPG, Campus Uvaranas, Bloco M, Sala 100.
 Bairro: Uvaranas CEP: 84.030-900
 UF: PR Município: PONTA GROSSA
 Telefone: (42)3220-3108 E-mail: coep@uepg.br

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
PONTA GROSSA - UEPG**



Continuação do Parecer: 1.682.031

Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	21/07/2016 16:00:32	Danielle Cristyane Kalva Borato	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	TermoAutorizacaoPesquisaPMPG.pdf	24/05/2016 11:50:51	JOSÉ CARLOS REBUGLIO VELLOSA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TermoDeResponsabilidadeVELLOSA.pdf	24/05/2016 11:50:00	JOSÉ CARLOS REBUGLIO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TermoDeResponsabilidadeOMAR.pdf	24/05/2016 11:49:47	JOSÉ CARLOS REBUGLIO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TermoDeResponsabilidadeDanielle.pdf	24/05/2016 11:49:35	JOSÉ CARLOS REBUGLIO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TermoDeResponsabilidadeCristiane.pdf	24/05/2016 11:49:20	JOSÉ CARLOS REBUGLIO	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	24/05/2016 11:47:48	JOSÉ CARLOS REBUGLIO	Aceito
Brochura Pesquisa	FormularioDePesquisaCredenciamento.pdf	24/05/2016 11:47:22	JOSÉ CARLOS REBUGLIO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoCompletoTranslocacaoMicrobiana.pdf	24/05/2016 11:46:06	JOSÉ CARLOS REBUGLIO VELLOSA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DeclaracaoUEPG.pdf	24/05/2016 11:01:13	JOSÉ CARLOS REBUGLIO VELLOSA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DeclaracaoIFPR.pdf	24/05/2016 11:01:01	JOSÉ CARLOS REBUGLIO VELLOSA	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	24/05/2016 10:58:29	JOSÉ CARLOS REBUGLIO	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto_completa.pdf	23/05/2016 19:52:59	Danielle Cristyane Kalva Borato	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PONTA GROSSA, 17 de Agosto de 2016

Assinado por:
ULISSES COELHO
(Coordenador)

Endereço: Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748. UEPG, Campus Uvaranas, Bloco M, Sala 100.
 Bairro: Uvaranas CEP: 84.030-900
 UF: PR Município: PONTA GROSSA
 Telefone: (42)3220-3108 E-mail: coep@uepg.br