

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Fernanda Tomé Sturzbecher

Efeitos arteriais da ativação de células T, monócitos e da imunidade ao Citomegalovírus (CMV) em crianças e adolescentes com infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV).

Ribeirão Preto
2018

FERNANDA TOMÉ STURZBECHER

Efeitos arteriais da ativação de células T, monócitos e da imunidade ao Citomegalovírus (CMV) em crianças e adolescentes com infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV).

Versão Original

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Programa de Saúde da Criança
e do Adolescente

Orientadora: Profa. Dra. Marisa Márcia Mussi

Ribeirão Preto
2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo na publicação
Serviço de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Sturzbecher, Fernanda Tomé

Efeitos arteriais da ativação de células T, monócitos e da imunidade ao Citomegalovírus (CMV) em crianças e adolescentes com infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). Ribeirão Preto, 2018.

143 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.

Orientador: Mussi, Marisa Marcia.

1. Risco cardiovascular. 2. HIV. 3. CMV. 4. Adolescentes. 5. Espessura da íntima/média de carótidas (cIMT). 6. Ativação imunológica.

Nome: Sturzbecher, Fernanda Tomé

Título: Efeitos arteriais da ativação de células T, monócitos e da imunidade ao Citomegalovírus (CMV) em crianças e adolescentes com infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV).

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento _____

*À minha família e a meus queridos
pacientes, que me inspiram à vida.*

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Professora Dra Marisa Marcia Mussi meus agradecimentos pela oportunidade de trabalhar com pesquisa clínica, por sua capacidade singular de estimular a minha atitude reflexiva, por sua disponibilidade sempre, sua condução na orientação de todo este trabalho e seu exemplo como profissional, que estará sempre refletindo nos meus caminhos.

A toda equipe do Núcleo de Estudos em Infecções Maternas, Pediátricas e Infantis (NEIMPI), pelo apoio no desenvolvimento do trabalho e todo o suporte para a realização da pesquisa. Em especial agradeço a enfermeira Fernanda Pires que trabalhou na coleta das amostras da pesquisa e se envolveu junto no atendimento aos participantes. Estendo o agradecimento as outras enfermeiras que passaram pelo núcleo neste período. À biomédica Cleonice Barbosa Sandoval por seu trabalho na coleta de exames, armazenamento de amostras e realização das análises de alguns marcadores; e por sua amizade e apoio constantes nesta trajetória. Estendo o agradecimento à biomédica Tatiana Balducci que também trabalhou na coleta, armazenamento e análise dos dados. Agradeço também às assistentes sociais do núcleo, que auxiliaram no contato com os participantes e na organização das visitas do estudo. E à Nayla pelo auxílio na organização dos documentos.

À Dra Aparecida Yulie Yamamoto e toda sua equipe do laboratório de virologia do HCRP, pela realização dos exames de detecção de recorrência do CMV e por seus ensinamentos que contribuíram muito para a minha formação.

À Patricia Vianna Bonini Palma que realizou as análises dos marcadores no laboratório de citometria de fluxo no Hemocentro de Ribeirão Preto e sempre esteve disponível a contribuir com o trabalho.

À equipe do Laboratório de sorologia do HCRP, onde foram realizados os exames de sorologia para CMV, em especial ao David Falango e a Camila, coordenadores do laboratório, sempre dispostos a ajudar.

À Dra Sara Reis Teixeira e ao Prof Dr Jorge Elias que conduziram a realização das ultrassonografias do estudo e contribuíram com a elaboração do planejamento e desenvolvimento do trabalho.

Ao estatístico Davi Casale Aragon pelo ajuda desde o planejamento até a análise dos resultados. Agradeço sua disponibilidade, incentivo e exercício reflexivo sobre os achados da pesquisa.

À Marcia Lima Isaac, pelo seu ombro amigo, pelo seu incentivo e por sua disponibilidade em me ajudar em momentos fundamentais do desenvolvimento da pesquisa. Além da sua colaboração para a minha formação em infectologia e para a minha paixão pela área.

À Profa. Dra. Maria Célia Cervi pela oportunidade de fazer parte da equipe da infectologia, por sua amizade e por todos os seus ensinamentos, que vão além do conhecimento científico, os quais me auxiliam na compreensão de todos os aspectos que envolvem o cuidar.

Aos meus amigos que fazem e fizeram parte da equipe da MI Infantil do HCRP, com quem dividi os desafios do trabalho e com quem me apaixono pelo atendimento as crianças e adolescentes com infecção pelo vírus HIV. Pelas emoções passadas juntos e pelos desafios enfrentados diariamente.

A toda equipe do Departamento de Pediatria que me deram suporte quando precisei. A todos os professores que participaram da minha formação científica durante o doutorado.

Aos participantes da pesquisa e seus cuidadores, pela contribuição no desenvolvimento do trabalho.

A minha família: a meu pai Benedito, minha mãe Anésia, minhas irmãs Flávia e Fabiana, alicerce forte que me dá suporte para enfrentar desafios. Agradeço também a Armide, Carlos, Julio, Silvana, Rafaela, Érico, Eduardo, Ana Lara pelo carinho sempre presentes.

Ao meu esposo Marcio, por todo o seu amor, por todo o apoio nos desafios que já passamos juntos e que fortalecem a nossa união.

Às minhas filhas Cecília e Elis, inspiração e revelação para a vida.

“Meu coração sangra com uma dor que não consigo comunicar a ninguém, recuso todos os toques e ignoro todas as tentativas de aproximação. Tenho vergonha de gritar que esta dor é só minha, de pedir que me deixem em paz e só com ela, como um cão com seu osso. A única magia que existe é estarmos vivos e não entendermos nada disso. A única magia que existe é a nossa incompreensão.”

Caio Fernando Abreu

RESUMO

STURZBECHER, Fernanda Tomé. **Efeitos arteriais da ativação de células T e monócitos e da imunidade ao Citomegalovírus (CMV) em crianças e adolescentes com infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)**. 2018. 144 páginas. Tese (Doutorado direto no Programa de Saúdeda Criança e do Adolescente) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

A infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) pode predispor à presença de fatores de risco cardiovascular e promover a ativação do sistema imunológico, contribuindo para a formação de lesões ateroscleróticas. A existência de coinfeções, como pelo Citomegalovírus (CMV) e a ativação imunológica inespecífica poderiam intensificar o processo de inflamação crônica e acelerar os danos vasculares decorrentes desta. O objetivo principal deste estudo foi avaliar se a recorrência da infecção pelo CMV, a magnitude da resposta imunológica específica ao CMV ou da ativação inespecífica de células T e monócitos associava-se ao aumento da espessura das camadas média e íntima das carótidas (cIMT) em crianças e adolescentes coinfectados pelo HIV e CMV. Consistiu-se de um estudo longitudinal, em que 40 crianças e adolescentes coinfectados pelo HIV e CMV foram acompanhados por 2 anos. Periodicamente avaliou-se a presença de recorrência do CMV, com o uso de detecção de DNA do CMV no soro por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase; a ativação imunológica perante este vírus com o ensaio do Quantiferon CMV^R, a dosagem de anticorpos IgM e IgG contra o CMV. Também, nós medimos a ativação imunológica inespecífica de células T usando a dosagem do receptor I de TNF solúvel (sTNFRI) e a quantificação da presença HLADR+CD38+TCD8+; e a de monócitos por meio da dosagem de CD14 solúvel (sCD14). Para caracterizar adicionalmente as crianças estudadas, outros parâmetros foram registrados periodicamente: 1-Relativos à infecção pelo HIV: parâmetros clínicos e quantificação de linfócitos CD4+/CD8+ e de RNA-HIV; 2-Parâmetros antropométricos: Peso, estatura, circunferência abdominal e Índice de Massa Corporal (IMC); 3-Parâmetros Laboratoriais: lipoproteínas, glicemia, insulinemia, hemoglobina glicosilada e cálculo do índice HOMA IR. Devido à baixa incidência de recorrência da infecção pelo CMV (0,97/100 pessoas-mês) não foi possível analisar este fator no presente estudo. De maneira geral, na entrada do estudo a

espessura da íntima/média das artérias carótidas da maioria (70%) dos adolescentes situava-se acima do Percentil 75 da distribuição de referência, sendo que durante o período de 2 anos não ocorreu incremento significativo da medida desse parâmetro arterial. Não foi identificada associação entre a magnitude da ativação da imunidade específica ao CMV e a evolução da cIMT ao longo de dois anos. Apesar de ter sido detectado que pequenos incrementos nos indicadores de ativação imunológica inespecífica (TNRFI, sCD14 e/ou HLADR+CD38+) associaram-se a discretas reduções da cIMT ao final de dois anos, a ativação imunológica de células T e monócitos não se associou ao incremento da espessura da íntima/média arterial durante esse período de tempo. Embora não tenhamos confirmado a nossa hipótese, dados obtidos nesse estudo podem se tornar referência para planejamento de estudos mais amplos e com maior período de observação.

Palavras chaves: risco cardiovascular, HIV, CMV, adolescentes, espessura da íntima/média de carótidas (cIMT), ativação imunológica.

ABSTRACT

STURZBECHER, Fernanda Tomé. **Arterial effects of T cell, monocyte and cytomegalovirus (CMV) immune activation in children and adolescents with Human Immunodeficiency Virus (HIV) infection.** 2018. 144 páginas. Tese (Doutorado direto no Programa de Saúde da Criança e do Adolescente) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Human Immunodeficiency Virus (HIV) infection might predispose the presence of cardiovascular risk factors and promote the activation of the immune system contributing to the formation of atherosclerotic lesions. The presence of coinfections, such as by Cytomegalovirus, and the immunological unspecific activation may intensify the process of chronic inflammation and accelerate the vascular damage resulting from it. The main objective of this study was to evaluate whether the recurrence of CMV infection and the degree of the CMV-specific cellular immune response or the unspecific activation of T cells and monocytes were associated with the increase in the thickness of the carotid intima-media thickness (cIMT) in HIV/CMV-coinfected children and adolescents. A longitudinal study was carried out in which 40 HIV/CMV-coinfected children and adolescents were followed-up for 2 years. Periodically, it was determined the presence of CMV recurrence with the use of CMV-DNA detection in serum by Polymerase Chain Reaction; the specific immunological activation of this virus with the Quantiferon CMV^R assay and the dosage of IgM and IgG antibodies against CMV. Also, we measured the nonspecific immunological activation of T cells using the soluble TNF receptor I (sTNFR1), and the presence of HLADR⁺CD38⁺TCD8⁺; and that of monocytes by soluble CD14 dosage (sCD14). To further characterize the studied children, other parameters were periodically evaluated: 1-HIV-related: clinical parameters and quantification of CD4⁺/CD8⁺ lymphocytes and HIV-RNA; 2-Anthropometric parameters: weight, height, abdominal circumference, and Body Mass Index (BMI); 3-Laboratory parameters: lipoproteins, fasting glucose, fasting insulinemia, glycosylated hemoglobin, and calculation of HOMA IR. Due to the low incidence of CMV recurrence (0.97/100 persons-month), it was not possible to analyze this factor in the present study. Overall, the cIMT of most (70%) adolescents were higher than the 75 percentile of the reference distribution at enrollment, and no significant increment occurred over a 2 year period. No association between the degree of CMV-specific immunity activation and the evolution of cIMT over 2 years was identified. Although it was found that small increments on the unspecific immunological activation markers (TNRF1,

sCD14 and/or HLADR+CD38+) were associated with discrete reductions of the cIMT at the end of two years, the immunological activation did not associate with an increment of the carotid intima/media thickness over this time period. Even if we have not confirmed our hypothesis, the data obtained in this study can be used for planning bigger studies with a more prolonged observation period.

Key words: cardiovascular risk, HIV, CMV, adolescents, carotid intima/media thickness (cIMT), immunologic activation.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 19 |
| 1.1. Infecção pelo vírus HIV..... | 20 |
| 1.1.1. Fisiopatologia da infecção..... | 20 |
| 1.1.2. Fisiopatologia em crianças e adolescentes..... | 22 |
| 1.2. Aterosclerose..... | 23 |
| 1.2.1. Fisiopatologia da aterosclerose..... | 24 |
| 1.2.2. Aterosclerose em crianças e adolescentes..... | 25 |
| 1.2.3. Risco cardiovascular e infecção pelo HIV..... | 26 |
| 1.3. Citomegalovírus..... | 29 |
| 1.3.1. Associação do CMV com aterosclerose..... | 31 |
| 1.3.2. Coinfecção HIV e CMV..... | 33 |
| 2. MÉTODOS..... | 40 |
| 2.1. Hipótese..... | 40 |
| 2.2. Objetivos..... | 40 |
| 2.2.1. Objetivos Principais..... | 40 |
| 2.2.2. Objetivos Secundários..... | 40 |
| 2.3. População de estudo..... | 40 |
| 2.4. Desenho de Estudo..... | 42 |
| 2.4.1. Avaliações clínicas..... | 45 |
| 2.4.1.1. Dados clínicos iniciais e de seguimento..... | 45 |
| 2.4.1.2. Avaliações antropométricas:..... | 46 |
| 2.4.1.3. Estadiamento puberal..... | 47 |
| 2.4.2. Avaliações laboratoriais..... | 47 |
| 2.4.2.1. Avaliação laboratorial de fatores de risco cardiovascular..... | 47 |
| 2.4.2.2. Avaliação da evolução do tratamento da infecção pelo vírus HIV..... | 48 |
| 2.4.2.3. Marcadores inespecíficos de ativação imunológica..... | 49 |
| 2.4.2.4. Recorrência da infecção pelo citomegalovírus..... | 51 |
| 2.4.2.5. Marcadores de ativação da imunidade específica ao citomegalovírus.. | 52 |
| 2.4.2.6. Avaliação da Espessura da camada íntima/média das artérias carótidas..... | 53 |
| 2.5. Aspectos éticos..... | 55 |
| 2.6. Coleta de dados..... | 55 |
| 2.7. Análise de dados..... | 55 |

| | |
|--|------------|
| 3. RESULTADOS | 59 |
| 3.1. Participantes do Estudo | 59 |
| 3.1.1. Composição dos participantes de estudo | 59 |
| 3.1.2. Características dos participantes do estudo | 59 |
| 3.2. Evolução do tratamento da infecção pelo vírus HIV ao longo do estudo..... | 64 |
| 3.3. Evolução das características clínicas dos indivíduos durante o período do estudo..... | 66 |
| 3.3.1. Estadiamento puberal | 66 |
| 3.3.2. Índice de Massa Corporal (IMC) | 66 |
| 3.3.3. Pressão arterial..... | 66 |
| 3.3.4. Circunferência abdominal | 67 |
| 3.3.5. Glicemia de jejum, insulinemia, Índice HOMA e Hemoglobina glicosilada..... | 67 |
| 3.3.6. Perfil lipídico..... | 67 |
| 3.4. Recorrência da infecção pelo CMV | 68 |
| 3.5. Evolução da espessura da íntima e média das artérias carótidas ao longo de 2 anos. | 71 |
| 3.6. Imunidade específica ao Citomegalovírus e marcadores de ativação imunológica..... | 75 |
| 3.6.1. Marcadores específicos da infecção pelo Citomegalovírus | 75 |
| 3.6.1.1. Sorologia para CMV..... | 75 |
| 3.6.1.2. Ativação da imunidade de células TCD8+ específica para o CMV com a produção de IFN-gama após estímulo antigênico (QuantiFERON-CMV ^R):..... | 76 |
| 3.6.2. Marcadores inespecíficos de ativação imunológica..... | 77 |
| 3.6.2.1. Receptor I de TNF alfa solúvel (sTNFRI) | 77 |
| 3.6.2.2. Molécula de CD14 solúvel (sCD14) | 78 |
| 3.6.2.3. Marcador CD3+CD8+HLADR ⁺ CD38 ⁺ | 79 |
| 3.7. Influência da imunidade específica ao CMV e de marcadores de ativação imunológica sobre a evolução da espessura das camadas íntima e média da artéria carótidas (cIMT) | 81 |
| 4. DISCUSSÃO | 94 |
| 5. CONCLUSÕES | 102 |
| 6. REFERÊNCIAS | 103 |
| ANEXOS | 116 |
| ANEXO 1. Termo de Consentimento Livre e esclarecido para pais e responsáveis..... | 116 |
| ANEXO 2. Termo de Assentimento para participantes..... | 121 |
| ANEXO 3. Detalhamento de dados do seguimento clínico dos participantes da pesquisa. | 123 |
| ANEXO 4. Instrumentos de coleta de dados utilizando REDCap..... | 126 |

1. INTRODUÇÃO

Nas quase quatro décadas desde a descoberta da infecção pelo vírus HIV houveram muitos avanços nos cuidados com os indivíduos infectados pelo vírus. Com o desenvolvimento da terapia antirretroviral de alta potência (TARV) a preocupação deixou de ser o controle da mortalidade em curto prazo pela doença e voltou-se para as complicações associadas ao estado de infecção crônica. Isto inclui tanto os danos decorrentes da ação do próprio vírus como aqueles ocasionados pelo uso crônico das medicações e pelas coinfeções. Estes aspectos tem sido enfoque não somente na abordagem dos adultos infectados como também de crianças e adolescentes.

Segundo a UNAIDS, em 2016 havia 2,1 milhões de crianças e adolescentes menores de 15 anos infectados pelo vírus HIV⁽¹⁾. A estimativa para a população adolescente (10 a 19 anos) em 2015 era de 1,8 milhões de infectados⁽²⁾. Apesar de ter havido 160 mil novas infecções pelo vírus HIV naqueles abaixo de 15 anos, este número diminuiu 47% desde 2010. Houve redução de 48% das mortes relacionadas à Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) entre 2005 e 2016 nesta população, ao contrário da estimativa para a faixa etária de 15 a 19 anos em que houve aumento de 45% das mortes entre 2005 e 2015 (4). A Organização Mundial de Saúde (OMS) avaliou que aproximadamente três quartos dos adolescentes vivendo com infecção pelo HIV adquiriram a infecção por transmissão vertical, refletindo a melhoria do tratamento antirretroviral com aumento da sobrevivência, com as crianças infectadas atingindo a idade adulta, principalmente nos países onde há acesso ao tratamento antirretroviral. Embora a prevenção da transmissão vertical tenha avançado, as novas infecções na população adolescente com idade acima de 15 anos têm aumentado, em decorrência de outras formas de exposição⁽²⁾. Em 2015 a estimativa era de ocorrência de 29 novas infecções pelo HIV entre jovens de 15 a 19 anos por hora, trazendo preocupações com os impactos desta doença neste grupo e os desafios do seu tratamento..

No Brasil, conta-se com programa nacional para prevenção e tratamento da infecção pelo HIV estruturado e a incidência de SIDA em crianças com idade inferior a 5 anos, que reflete a transmissão vertical da infecção, se mantêm em queda nos últimos 5 anos, tendo sido de 2,4% em 2016⁽³⁾. No entanto, ainda existem falhas no diagnóstico e cuidado de gestantes e lactantes infectadas e crianças expostas, não havendo eliminação das infecções. Entre 2006 e 2016 houve um aumento de 14% no diagnóstico da infecção entre adolescentes

de 15 a 19 anos. Os desafios do tratamento da população pediátrica e adolescente e dos cuidados para a prevenção das complicações de longo prazo, portanto, se encontram presentes, e exigem particularidades na abordagem.

Entre adultos com a infecção pelo HIV [HIV(+)] há aumento do risco cardiovascular. O infarto agudo do miocárdio (IAM) pode ocorrer com frequência 26% maior em relação à população geral⁽⁴⁾. Os aumentos do colesterol total, dos triglicerídeos e da presença de diabetes nesta população se associam à maior incidência de IAM. Além dos fatores de risco cardiovascular (RCDV) já conhecidos, há outros mecanismos envolvendo o aumento das doenças cardiovasculares em pacientes HIV(+), decorrentes de alterações em nível celular e molecular que ocorrem com a infecção e com o seu tratamento, associados a fatores genéticos e ambientais.

Em crianças e adolescentes HIV(+) já foi evidenciado o desenvolvimento de alterações vasculares precoces⁽⁵⁾, sendo que estas têm associação com diferentes fatores, como em adultos: alterações metabólicas, o uso de antirretrovirais e resposta inflamatória desencadeada pelo próprio vírus. A avaliação das crianças e adolescentes pode permitir verificar os efeitos associados à infecção e à terapia, já que usualmente os demais fatores de risco cardiovascular não se encontram presentes nesta faixa etária. Além disso, o processo de crescimento e desenvolvimento em que se encontram constituem uma base biológica diferente em que irão atuar os efeitos nocivos da infecção, podendo os diferentes fatores atuar de forma diferenciada da observada nos adultos.

1.1. Infecção pelo vírus HIV

1.1.1. Fisiopatologia da infecção

O conhecimento da fisiopatologia da infecção pelo vírus HIV vem avançando de modo acelerado. É evidente que a ação viral não se resume ao impacto no sistema imunológico em termos quantitativos, mas também qualitativos e funcionais, com um leque amplo de possíveis impactos na saúde do indivíduo. A infecção produz um conjunto de alterações em nível celular e molecular que interagem com fatores genéticos e ambientais e resultam na expressão das diferenças clínicas que são observadas entre os indivíduos infectados em relação àqueles sem a infecção. O uso das terapias antirretrovirais pode reduzir estas

alterações, mas também pode atuar como coadjuvantes para estas, que resultarão no processo de envelhecimento precoce e no aumento do risco das complicações não infecciosas.

A infecção pelo vírus HIV não tratada se associa a um nível de inflamação persistente, com a presença de altos níveis de citocinas inflamatórias e também ativação do sistema de coagulação. A maioria destes marcadores sofre diminuição com o tratamento antirretroviral, no entanto ainda persiste a inflamação evidenciada pelos maiores níveis de citocinas como IL-6, proteína C reativa e D-dímeros⁽⁶⁾. As causas desta inflamação incluem vários processos como: a própria replicação do vírus mesmo em baixos níveis; a presença de outras coinfeções, como a dos vírus herpes, em especial o Citomegalovírus; a translocação de lipopolissacarídeos (LPS) através da mucosa intestinal que não se encontra com toda a sua integridade; a perda de células T de regulação e outras células reguladoras da resposta imunológica; associados à fibrose do timo e de outras estruturas do sistema linfóide.

A mucosa intestinal é acometida nos estágios iniciais da infecção, sendo o local principal no qual se estabelece a infecção inicial para posterior disseminação em crianças que adquirem a infecção por transmissão vertical. O vírus infecta e se estabelece no tecido linfóide de mucosas, onde replica e reduz a quantidade de células T CD4+, importantes para a manutenção da integridade da mucosa. A infecção pode, assim, resultar em uma enteropatia, com inflamação persistente da mucosa, com produção de muitas citocinas e consequente dano celular⁽⁷⁾. O dano a mucosa resulta na ocorrência de passagem de produtos bacterianos ou até de bactérias inteiras para a circulação (translocação bacteriana), ou pela lâmina própria para o peritônio. Esse processo contribui para a ativação imunológica persistente, afetando principalmente as células da linhagem monocitária. Um dos marcadores da translocação e da ativação de células pelo LPS é a dosagem da molécula de CD14 solúvel (sCD14). A presença de marcadores de translocação mesmo com controle virológico da infecção aumenta o risco de comorbidades e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares⁽⁸⁾.

Com o envelhecimento, o sistema imunológico, assim como os demais tecidos do organismo, passa por alterações, denominado "*immunosenescence*". Este processo ocorre mais precocemente na infecção pelo vírus HIV, principalmente em indivíduos sem tratamento. Uma das características principais é a perda de capacidade proliferativa das células T, havendo progressivamente predominância das células T efetoras, resultantes do processo de expansão clonal prévio desencadeado por um estímulo antigênico. As células T efetoras apresentam telômeros mais curtos e menor capacidade de proliferação, portanto possuem menor

potencial de resposta a antígenos. No entanto, desencadeiam um processo inflamatório que pode até resultar em danos ao organismo, havendo evidências de aumento da produção de algumas citocinas pró-inflamatórias. Os outros processos já descritos são: diminuição da razão células CD4+/CD8+; diminuição da razão células *naive*/memória; redução do repertório de células T; aumento do número de células T ativadas; aumento da produção de IL-6; baixa produção de IL-2 e alta produção de Interferon-gama (IFN- γ) pelas células TCD8+; redução da função do timo e expansão de células TCD8+ específicas para o CMV.

O impacto clínico deste processo é evidenciado pela baixa resposta imunológica a vacinas encontrada nos indivíduos infectados pelo HIV em relação aos não infectados, apresentando um padrão que se assemelha a indivíduos mais idosos sem a infecção. O tratamento antirretroviral diminui esta disfunção, porém não a elimina, evidenciando que mesmo as terapias disponíveis atualmente não são totalmente eficazes para a reversão deste processo.

Além do impacto no sistema imunológico, outros processos típicos do envelhecimento se apresentam precocemente em indivíduos portadores de infecção pelo vírus HIV e englobam⁽⁹⁾:

- Modificações da expressão genética e a ação epigenética;
- encurtamento de telômeros por mecanismos ligados ao próprio vírus ou efeitos das medicações, como dos inibidores da transcriptase reversa sobre a enzima transcriptase reversa telomerase;
- disfunção mitocondrial com estresse oxidativo e produção de radicais livres que comprometerão diferentes tecidos;
- comprometimento da regulação da morte celular;
- alteração da expressão e função de algumas proteínas e do metabolismo de lipídeos, da glicose e neuroendócrinos;

1.1.2. Fisiopatologia em crianças e adolescentes

As evidências sobre as alterações imunológicas que ocorrem nas crianças com infecção pelo HIV desde o nascimento são menos robustas, mas há alguns aspectos que as diferenciam⁽¹⁰⁾.

A presença da infecção pelo HIV desde os primeiros anos de vida expõem crianças precocemente ao processo inflamatório crônico e a alterações que envolvem o

envelhecimento imunológico, o que pode resultar em complicações clínicas mais precoces. O grande número de células T presentes na infância e o Timo favorecem a infecção e replicação viral em altos níveis. Estudos demonstraram que o nível da carga viral se relaciona ao risco de progressão da doença⁽¹¹⁾, no entanto não pode ser avaliado isoladamente de outros fatores, como o número e a porcentagem de células CD4+. Com relação a ativação de células T e as alterações funcionais que podem ser encontradas nestas, estudos demonstraram que a intensidade da viremia pode não ser importante neste processo, mas sim a intensidade da própria resposta imunológica do indivíduo⁽¹²⁾.

Com relação à translocação bacteriana e de seus subprodutos possivelmente ela ocorra com maior frequência e intensidade nas crianças, tendo em vista a maior permeabilidade das mucosas intestinais⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾. As profilaxias com uso de antibióticos utilizadas na infância podem também contribuir neste processo. Além disso a progressão da doença materna e o seu tratamento se relacionam com a progressão da criança, indicando poder influenciar na ativação imunológica e demais fatores que envolvem esta progressão⁽¹⁵⁾.

As coinfeções, principalmente pelo Citomegalovírus, resultam em maior estimulação imunológica e ativação, com maior risco de progressão da doença e até complicações⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾. Assim é que marcadores de ativação imunológica de células T se associam com a presença do CMV.

O tratamento precoce auxilia na prevenção deste processo além de diminuir que a quantidade de vírus que atinge as células que constituem o reservatório viral, resultando posteriormente em menor ativação imunológica.

1.2. Aterosclerose

A aterosclerose consiste do processo de estreitamento dos vasos arteriais decorrentes do acúmulo de fibrina e proliferação de células musculares lisas na parede dos vasos. Este processo é decorrente de uma cascata de eventos que resultam na ativação imunológica que levará a formação da lesão arterial. Os fatores de risco já conhecidos que contribuem ao desencadeamento desta reação são as alterações de perfil lipídico, a resistência insulínica e o diabetes, a hipertensão arterial, a obesidade (acúmulo de gordura principalmente em região abdominal), o uso de tabaco, fatores genéticos representados pela história familiar de risco cardiovascular e a presença de estado inflamatório persistente decorrente de ativação

imunológica, como ocorre em algumas doenças autoimunes e em algumas infecções. Além destes fatores de risco há os fatores que se associam a aterosclerose como alguns hábitos alimentares e de pouca atividade física, o avanço da idade, o gênero, com maior risco masculino, e fatores perinatais⁽¹⁸⁾.

1.2.1. Fisiopatologia da aterosclerose

A aterosclerose consiste de um processo inflamatório crônico em que o sistema imune interage com os fatores de risco metabólicos para iniciar, manter e ativar as lesões arteriais⁽¹⁹⁾⁽²⁰⁾⁽²¹⁾.

Existe um tecido linfoide associado a vasos (VALT) que se constitui de: linfócitos T ativados e macrófagos ativados. Poucas células dendríticas, mastócitos e raras células *natural killer* podem ser encontradas. Nos estágios iniciais da aterosclerose há a presença de linfócitos T dispostos em aglomerados na íntima que com a evolução da formação da placa infiltram aleatoriamente esta camada. Nas lesões avançadas eles se acumulam na borda da placa. Os linfócitos T se localizam nas camadas íntima e na adventícia dos vasos, estando próximas à inervação autonômica nesta região e expressam marcadores de ativação celular⁽²²⁾. Os macrófagos apresentam morfologia normal em vasos sem alterações. Quando se inicia o processo de aterosclerose já é possível observar a transformação destes em células espumosas. Nas lesões avançadas há o acúmulo central de lipídios nas placas, com formação de cristais de colesterol e consequente morte celular dos macrófagos locais, deixando a camada mais interna da placa com conteúdo lipídico acelular e os macrófagos se apresentam somente circundando a estrutura central. As células dendríticas e as musculares lisas também podem evoluir para células espumosas com a progressão da lesão.

A placa fibrosa formada é responsável pelos eventos danosos decorrentes da obstrução do lúmen vascular, da liberação na corrente sanguínea de substâncias trombogênicas após sua ruptura, com síndromes isquêmicas agudas, ou da ruptura do vaso.

A medida da espessura das camadas íntima e média das artérias carótidas (cIMT) representa o efeito cumulativo de diferentes eventos que atuam nos estágios iniciais da aterosclerose e que levam à disfunção endotelial com consequente aumento progressivo da íntima e média das artérias. Este aumento é considerado o evento mais precoce típico do desenvolvimento de aterosclerose e pode ser utilizado em crianças em idades tão precoces

quanto 10 anos, consistindo em um preditor independente de risco cardiovascular⁽²³⁾⁽²⁴⁾⁽²⁵⁾. Ela se constitui numa medida de avaliação indireta da aterosclerose que representa o risco de desenvolvimento das doenças cardiovasculares no futuro. Como medida de avaliação da progressão da aterosclerose ela é amplamente utilizada em ensaios clínicos tanto para avaliação de riscos como de medidas terapêuticas. Na prática clínica ainda não há o consenso para o seu uso, embora ela possa ser utilizada como avaliação adicional em adultos classificados com moderado risco cardiovascular. Em crianças e adolescentes ela não é recomendada na prática clínica.

Além das alterações estruturais que podem ser evidenciadas por métodos não invasivos, a dosagem de marcadores inflamatórios e de coagulação se associaram ao desenvolvimento de aterosclerose e podem auxiliar na identificação do risco desta, embora não exista consenso sobre o uso destes em diferentes grupos de indivíduos. A proteína C reativa de alta sensibilidade (hsPCR) é o marcador de inflamação crônica que vem sendo mais utilizado e que associado aos demais fatores de risco cardiovascular tem valor prognóstico para o desenvolvimento futuro de lesões ateroscleróticas⁽²⁶⁾⁽²⁷⁾.

1.2.2. Aterosclerose em crianças e adolescentes

Em estudos longitudinais que avaliaram crianças e adolescentes até a idade adulta, a compreensão dos fatores envolvidos no desenvolvimento de aterosclerose colocaram em evidência que a infância e adolescência são períodos muito importantes neste processo. Embora a presença da aterosclerose e as complicações decorrentes desta ocorram na idade adulta, pesquisas ao longo dos últimos 40 anos vêm demonstrando que a alteração de base da aterosclerose se desenvolve desde a infância e progride ao longo da vida do indivíduo de acordo com a presença e intensidade dos fatores de risco. Avaliações não invasivas de adultos e achados anatomopatológicos de placa aterosclerótica em jovens foram identificados⁽²⁸⁾⁽²⁹⁾. O período de maior progressão de estrias gordurosas para placas fibrosas ocorre a partir dos 15 anos de idade e se correlacionam com os fatores de risco cardiovascular⁽²⁵⁾.

O *Bogalusa Heart Study* e o *Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY)* são dois grandes estudos que demonstraram alterações anatomopatológicas da aterosclerose em indivíduos que faleceram por causas externas e identificaram associação entre as características das lesões com a presença e intensidade de fatores de risco

cardiovascular. Os fatores de risco identificados foram as alterações de perfil lipídico, a elevação de pressão arterial, a obesidade e o uso de cigarro, a presença de diabetes mellitus e o avanço da idade.

A aterosclerose sintomática não é encontrada em crianças e adolescentes, mas alterações vasculares precoces que evoluem para a formação da placa aterosclerótica podem ser encontradas em crianças e avaliadas por métodos não invasivos, como a utilização de medidas ecográficas como a cIMT⁽³⁰⁾. Outras medidas são a demonstração de deposição de cálcio em coronárias em imagens de Tomografia Computadorizada, medidas de distensibilidade endotelial na artéria braquial e avaliação da massa ventricular esquerda com o ecocardiograma.

A utilização da cIMT na avaliação de crianças e adolescentes deve levar em consideração que esta medida apresenta aumento com a idade e a estatura de crianças e adolescentes, além de existir diferenças em relação ao sexo, podendo o aumento identificado ser diferente de acordo com a artéria avaliada. Ishizu e colaboradores demonstraram que ocorre um aumento linear das artérias carótida em crianças e adolescentes de 5 a 14 anos de aproximadamente 0,009mm ao ano⁽³¹⁾, que não foi evidenciado nos demais estudos⁽³²⁾⁽³³⁾⁽³⁴⁾⁽³⁵⁾. Ainda não é totalmente claro se as diferenças encontradas relacionadas com a idade são decorrentes de uma adaptação vascular normal que ocorre com o crescimento ou são alterações patológicas e os mecanismos que influenciam com a espessura nesta faixa etária com o desenvolvimento puberal ainda não foram bem estudados. Outras medidas tem sido propostas neste grupo devido a estas dificuldades relacionadas ao processo de crescimento⁽³⁶⁾.

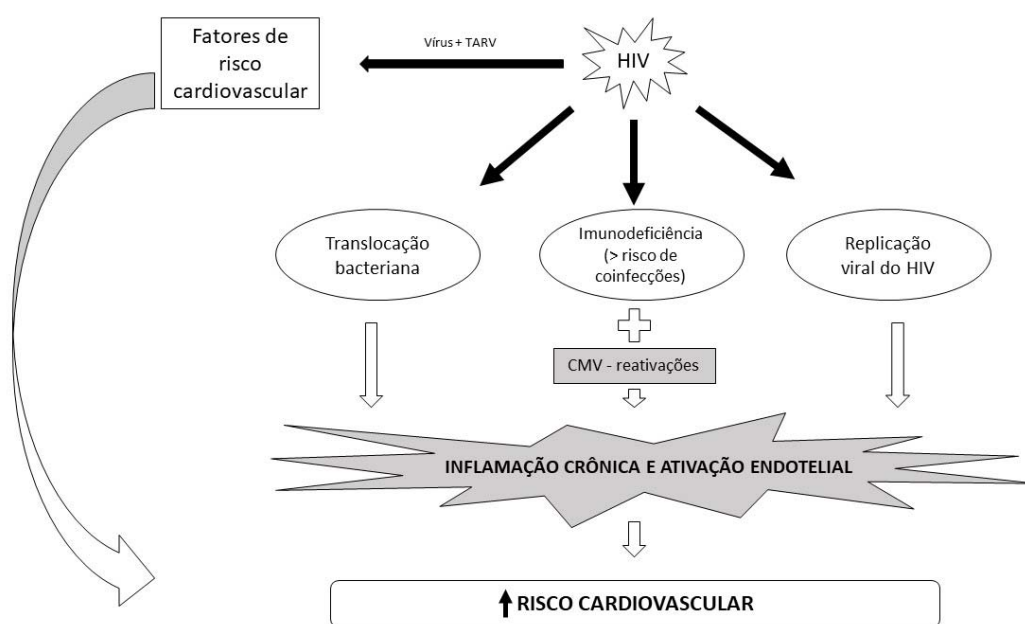
Tendo em vista a sua ampla utilização em pesquisa clínica foram estabelecidos valores de referência para adultos⁽³⁷⁾, que englobam adolescentes a partir de 15 anos. Valores de referência para crianças e adolescentes foram propostos em 4 estudos de populações específicas, utilizando medidas manuais ou semiautomatizadas e podem servir de referência para identificação de alterações em crianças a partir dos 10 anos⁽³²⁾⁽³³⁾⁽³⁴⁾⁽³⁵⁾.

1.2.3. Risco cardiovascular e infecção pelo HIV

A infecção pelo HIV constitui-se num fator de risco para aterosclerose, independente da presença dos fatores de risco tradicionais. Os aspectos característicos da infecção

envolvem: a persistente replicação viral do HIV; a imunodeficiência associada ao maior impacto das coinfeções, como a causada pelo CMV; e a translocação bacteriana. Estes constituem os três principais fatores que por diferentes mecanismos resultarão na ativação imunológica crônica e no dano endotelial⁽³⁸⁾. Além disso a infecção pelo HIV pode levar a ocorrência dos demais fatores de risco, tanto pela ação viral direta como em consequência do uso das medicações antirretrovirais. O fluxograma abaixo sintetiza estas relações.

Figura 1. Fluxograma representativo dos fatores associados ao aumento do risco cardiovascular na infecção pelo vírus HIV.



Com relação a viremia plasmática há evidências de que a proteína de superfície gp120 estimula as células endoteliais a produzirem fatores tissulares que estimulam o início da cascata de coagulação. Citocinas inflamatórias e outras proteínas virais sinergicamente podem promover a ativação endotelial, apoptose ou proliferação celular. O estudo SMART demonstrou menor risco de doenças cardiovasculares entre os indivíduos que fizeram uso contínuo de antirretrovirais, sugerindo que a viremia plasmática é importante para a aterosclerose⁽³⁹⁾.

A associação entre a baixa contagem de células CD4+ e o aumento do risco cardiovascular foi evidenciado em diferentes estudos⁽⁴⁰⁾⁽⁴¹⁾, embora existam questionamentos relacionados a reconstituição imune e as implicações desta na estimulação da inflamação e do dano cardiovascular⁽⁴²⁾. Além disso a associação dos baixos níveis de CD4+ podem refletir

indiretamente a importância de outros fatores, como os efeitos inflamatórios de coinfeções, em especial pelo Citomegalovírus ou até mesmo a própria replicação viral do vírus HIV.

A translocação bacteriana ou de produtos destas demonstrou aumentar os níveis de D-dímeros e do risco de trombose, aumentando a morbidade e mortalidade em indivíduos infectados. Os níveis de molécula CD14 solúvel também se associaram a maior morbidade e mortalidade em alguns estudos, corroborando a ideia de que a translocação tem papel importante na imunoestimulação, se associando ao risco cardiovascular⁽⁴³⁾.

Entre as alterações metabólicas já descritas, a infecção pelo HIV causa lipodistrofia com acúmulo de gordura central que se associa à resistência a insulina. Algumas medicações, em especial os análogos nucleosídeos, interferem no metabolismo mitocondrial e aumentam o risco de toxicidade oxidativa. Esta toxicidade se associa à redistribuição de gordura corporal e outras alterações metabólicas⁽⁴⁴⁾⁽⁴⁵⁾.

A lipodistrofia é comum em crianças com infecção pelo HIV, atingindo aproximadamente 29% daquelas em uso de terapia antirretroviral de alta potência (TARV)⁽⁴⁶⁾. Esta alteração da composição corporal em conjunto com as alterações de metabolismo lipídico e da glicose são fatores que aumentam o risco cardiovascular em adultos. Werner et al encontraram 88% de prevalência de dislipidemia e 14% de alterações corporais em crianças brasileiras infectadas pelo HIV⁽⁴⁷⁾.

Em estudos que avaliaram alterações ateroscleróticas precoces, a espessura da íntima-média da carótida (cIMT) foi uma medida utilizada que evidenciou diferenças entre as crianças e adolescentes infectadas pelo vírus HIV e crianças sem a infecção. Charakida e colaboradores encontraram diferença significativa entre a cIMT de pacientes com infecção pelo HIV e pacientes saudáveis, além de observar associação direta da cIMT com a idade do paciente, identificando o aumento de 0,005mm em espessura para cada ano de idade⁽⁴⁸⁾, observaram associação do aumento com o uso de Inibidores de Protease (IP) e estágios mais avançados da classificação do CDC.

O controle dos fatores de risco cardiovascular clássicos e o controle da infecção pelo vírus HIV resultaram em impacto positivo sobre a cIMT em alguns estudos, evidenciando que as alterações vasculares são resultado da interação destes, havendo benefícios na prevenção e tratamento dos processos que favorecem a aterosclerose⁽⁴⁹⁾.

Os biomarcadores de ativação imune e de disfunção cardiovascular também vem sendo utilizados em estudos clínicos envolvendo crianças e adolescentes. Miller e

colaboradores encontraram maiores níveis de biomarcadores de disfunção cardiovascular em jovens com infecção pelo HIV do que em jovens sem a infecção⁽⁵⁰⁾. Os biomarcadores avaliados foram a molécula de adesão intercelular (ICAM), molécula de adesão da célula vascular (VCAM), proteína 1 quimioatraente de monócitos (MCP-1) e interleucina-6 (IL-6). A presença de maior relação cintura/quadril e a gravidade da infecção pelo HIV também foram fatores associados ao aumento dos biomarcadores.

Na prática clínica a presença da infecção pelo vírus HIV em crianças e adolescentes representa um fator de risco cardiovascular moderado⁽¹⁸⁾, exigindo uma vigilância com relação a presença dos demais fatores de risco, a aplicação mais cuidadosa das medidas de prevenção destes e a adoção de intervenções quando aplicáveis. A compreensão das alterações metabólicas, moleculares e celulares que ocorrem na infecção pelo HIV e como elas se processam nas crianças e adolescentes são importantes para que sejam estabelecidas abordagens que possam melhorar a qualidade de vida futura desta população e a sua expectativa de vida.

1.3. Citomegalovírus

O Citomegalovírus (CMV) é um vírus com distribuição universal. A prevalência da infecção aumenta com a idade e o momento da infecção pelo vírus se relaciona a condições ambientais de vida que podem proporcionar contato precoce ou tardio com o vírus. Em geral, em populações com menor nível socioeconômico, a infecção é adquirida nos primeiros anos de vida e nos níveis sociais mais elevados em idades mais avançadas⁽⁵¹⁾.

A transmissão materna do CMV depende da soroprevalência da infecção entre as mulheres em idade reprodutiva. Em populações onde esta prevalência é alta, mais de 50% das crianças adquirem o vírus no primeiro ano de vida. As crianças ainda podem adquirir a infecção no berçário logo após o nascimento ou quando entram em contato com outras crianças ou adultos que excretam o vírus, principalmente quando começam a frequentar creches e escolas⁽⁵²⁾.

A infecção do CMV possivelmente ocorre por meio das mucosas (sistema genitourinário, vias aéreas, gastrointestinal), por via hematogênica (inclui a vertical), pela transfusão de hemoderivados e transplantes. Os leucócitos e as células endoteliais são muito importantes para a disseminação do vírus.

O CMV é um *β -herpesvírus* que infecta diferentes tipos de tecidos e se multiplica em diferentes tipos de células, como as células endoteliais, musculares lisas e fibroblastos⁽⁵³⁾. Nestes diferentes locais os vírus podem se situar em capilares e veias e ativarem linfócitos circulantes, mantendo uma latência de ativação imunológica celular alta mesmo com a imunidade preservada. O tipo de célula que mais comumente apresenta as alterações citopatológicas típicas da invasão viral é a célula epitelial ductal. Após infecção inicial, o CMV é excretado em diferentes fluidos orgânicos: saliva, sêmen, urina, lágrima, fluido cervicovaginal e leite materno. Esta excreção é resultante da infecção das células epiteliais glandulares. Isto reflete a disseminação do vírus a vários órgãos, sendo que a replicação na saliva e na urina pode indicar a via inicial de infecção.

O vírus persiste no organismo humano de forma permanente, apresentando diferentes mecanismos de evasão do reconhecimento pelo sistema imunológico. As células da medula óssea e sangue periférico precursores monocitários são os principais reservatórios da infecção latente. Quando estas células se diferenciam e multiplicam ocorre a replicação viral. As análises já realizadas até o momento suportam a evidência de que o CMV permaneça latente nas células progenitoras mielomonocíticas na medula óssea e monócitos CD14+ infectados circulam no sangue periférico. A diferenciação de monócitos infectados de forma latente em macrófagos tissulares por estimulação alogênica (transfusão, transplante) ou por liberação de citocinas pro-inflamatórias como ocorre em infecções, levam a replicação do CMV, com quadros de reativação da infecção por este vírus.

Tanto a resposta imune humoral quanto a celular são importantes para a defesa contra a infecção pelo CMV. As células Natural Killer (NK), componentes da imunidade inata, são essenciais para o controle inicial da infecção. Os anticorpos protegem contra a infecção e a doença, mas ainda não foram definidos os níveis exatos para a proteção. A defesa humoral passiva isoladamente não consegue prevenir a infecção, e a extensão em que a imunização adquirida com a infecção natural previne e limita a reinfecção ainda é desconhecida.

A imunidade celular é essencial na resposta ao CMV e as células T são fundamentais no controle da replicação viral e na prevenção do desenvolvimento de doença. A infecção pelo por este vírus estimula uma expansão de células T específicas que auxiliam no controle da infecção e tem uma representação expressiva no conjunto de células T do organismo de um indivíduo, que aumenta ainda mais com o envelhecimento, podendo chegar até metade de todo o conjunto de células TCD8+.

Quadros mais graves de doença ocorrem em pacientes com comprometimento da imunidade celular, como os pacientes com infecção pelo HIV.

O CMV produz uma infecção produtiva, permanente, com a viremia e excreção do vírus em sítios específicos por meses a anos mesmo em face da resposta imune do hospedeiro⁽⁵⁴⁾⁽⁵⁵⁾. O vírus possui mecanismos de evasão da resposta imune do hospedeiro, como sequestro de quimiocinas, competição com receptor de TNF, interferência na apoptose, diminuição da expressão do MHC de classe II na superfície de macrófagos e proteção das células infectadas da ação do complemento.

1.3.1. Associação do CMV com aterosclerose

A hipótese de que as infecções possam ser fatores causais para a aterosclerose, principalmente as causadas pelos vírus Herpes, vêm sendo avaliada há muitos anos. Estudos experimentais e populacionais já evidenciaram a presença desta relação para o Citomegalovírus, um dos principais agentes com evidências de associação com os danos vasculares⁽⁵⁶⁾⁽⁵⁷⁾. Proteínas e material genético do CMV foram encontrados nas células musculares lisas de placas de artérias carótidas de pacientes durante endarterectomia e outras cirurgias vasculares.

Os títulos de Anticorpos da classe IgG contra o CMV se associaram diretamente ao desenvolvimento de aterosclerose em pacientes submetidos à arterectomia⁽⁵⁸⁾ ou que evoluíram com doença coronariana após transplante cardíaco⁽⁵⁹⁾. Nieto e colaboradores encontraram associação entre a elevação dos títulos de anticorpos contra o CMV e a presença de maior espessura da íntima e média das artérias carótidas após 13 a 18 anos da avaliação laboratorial, em pacientes da coorte ARIC (*Atherosclerosis Risk in Communities*), avaliados entre 1987 e 1993, com exames laboratoriais coletados em 1974. A associação manteve-se estatisticamente significativa após controle dos demais fatores de risco para o desenvolvimento de aterosclerose⁽⁶⁰⁾.

A presença de títulos mais elevados de anticorpos pode estar associada à presença de reativações da infecção pelo CMV em pacientes que apresentam a infecção latente. Estas reativações podem ser desencadeadas por períodos de leve comprometimento imunológico ou estresse físico e psicológico.

Diferentes mecanismos são propostos para explicar a associação do CMV com o desenvolvimento de aterosclerose. Os vírus Herpes podem alterar o metabolismo lipídico⁽⁶¹⁾ e estudos em animais demonstraram que o CMV pode levar a acúmulo maior de lipídeos na parede vascular⁽⁶²⁾. Os vírus podem ainda causar dano imunológico nos vasos pela deposição de imunocomplexos e a replicação viral pode destruir as células musculares lisas, comprometendo a reparação dos danos vasculares⁽⁶³⁾. O vírus pode desencadear mutações das células musculares que levam à sua proliferação e à consequente formação de placas (Tumilowicz; Speir). Além disso, o vírus pode causar lesões endoteliais que desencadeiam a cascata de coagulação e consequente aterosclerose. Os mecanismos propostos estão sumarizados no Quadro 1.

Quadro 1- Mecanismos fisiopatogênicos propostos para explicar a ação do CMV no desenvolvimento de aterosclerose⁽⁵³⁾.

| TIPO DE ESTUDO | RESULTADO | REFERÊNCIA |
|--|---|----------------------------------|
| <i>In vitro</i> | | |
| Células musculares lisas humanas (CML) | Infecção pelo CMV das CML aumenta p53; IE84 se liga e inibe p53 | Speir et al ⁽⁶⁴⁾ |
| Células da linhagem promonócítica | Células endoteliais (CE), CML e exposição a LDL aumenta a reativação do CMV. | Guetta et al ⁽⁶⁵⁾ |
| CML | IE84 antagoniza a apoptose mediada pelo p53 | Tanaka et al ⁽⁶⁶⁾ |
| CML de ratos | Infecção CMV humano leva a proliferação das CML; aumento da migração das CML através dos fatores de crescimento derivados de plaquetas (FCDP); aumento da expressão do receptor de FCDP | Zhou et al ⁽⁶⁷⁾ |
| CML | US28 do CMV promove a migração na presença de quimiocinas | Streblow et al ⁽⁶⁸⁾ |
| <i>In vivo</i> | | |
| Ratos com e sem hipercolesterolemia | CMV aumenta a acumulação de lipídeos na parede arterial | Tumilowicz et al ⁽⁶⁹⁾ |
| Ratos, transplante aórtico alográfico | CMV aumenta proliferação de CML e aumenta alterações ateroscleróticas da íntima | Lemstrong et al ⁽⁷⁰⁾ |
| Ratos, transplante aórtico alográfico | CMV aumenta a proliferação intimal em enxertos não compatíveis (diferente MHC) | Li F et al ⁽⁷¹⁾ |
| Pacientes com transplante cardíaco | CMV associado a aumento da aterosclerose no enxerto, aumento da rejeição e diminuição da sobrevida | Grattan et al ⁽⁷²⁾ |
| Pacientes com transplante cardíaco | CMV em 62% dos pacientes com doença coronariana (DC) pós-transplante e 25% dos pacientes sem DC | McDonald et al ⁽⁵⁹⁾ |

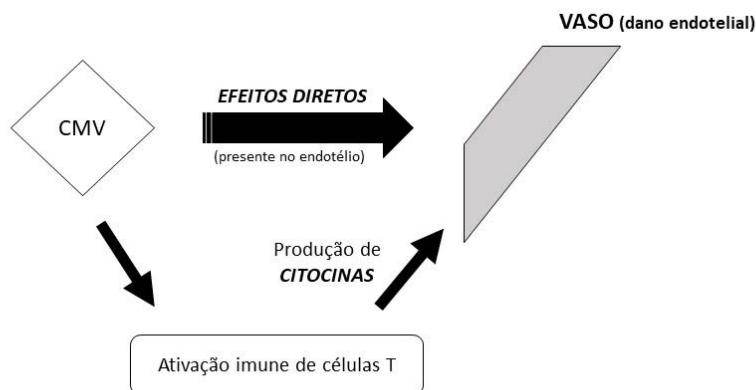
| | | |
|---|--|-----------------------------|
| Pacientes com re-estenose após angioplastia | CMV nas lesões foi associado a aumento de p53 | Speir et al ⁽⁶⁴⁾ |
| Pacientes pós arterectomia | CMV associado a re-estenose em 43% contra 8% de pacientes s/ CMV | Zhou et al ⁽⁷³⁾ |
| Ratos com dano carotídeo | CMV aumenta a formação da neoíntima | Zhou et al ⁽⁶⁷⁾ |

IE: Immediate early

Fonte: adaptado de Cytomegalovirus in *Fields Virology*, fourth edition, 2001⁽⁵³⁾

Em resumo, sugere-se que reativação do CVM seja seguida pelo aumento da inflamação e do dano vascular. Os monócitos circulantes são atraídos para a formação das lesões, o vírus latente volta a replicar nos monócitos, ativado pelas citocinas inflamatórias e pelo contato com células endoteliais, células musculares lisas e lipoproteínas de baixa densidade oxidadas⁽⁶⁵⁾. A reativação do CMV, então, promoverá as mudanças vasculares e o desenvolvimento da aterosclerose com a proliferação das células musculares lisas, acúmulo de lipoproteínas, alteração intimal e diminuição do lúmen vascular.

Figura 2. Fluxograma dos mecanismos de aumento do risco cardiovascular do CMV.



1.3.2. Coinfecção HIV e CMV

A soroprevalência da coinfecção HIV/ CMV é alta e a influência do CMV na estimulação crônica do sistema imunológico e no envelhecimento precoce deste já foram descritas⁽⁷⁴⁾.

Em pacientes com comprometimento imunológico, o desenvolvimento de doença pelo CMV pode ser decorrente de reativação do vírus latente, reinfecção ou contato primário com o vírus. O diagnóstico de doença requer a detecção do vírus e a determinação de que ele esteja

causando doença ativa. A excreção viral em sítios específicos e a viremia transitória são comuns em pacientes com comprometimento da imunidade celular, como os infectados pelo vírus HIV, mesmo quando não há doença aparente em atividade. Outros grupos apresentam risco maior de recorrência viral como indivíduos idosos, pessoas em condições graves de saúde, como os internados em Unidades de Terapia Intensiva, e os receptores de transplantes de órgãos sólidos, que necessitam de monitorização contínua pelo risco de evolução para doença. Além disso situações clínicas específicas, como na presença de doença coronariana, seja ela estável ou instável, já foi demonstrada a presença de viremia pelo CMV com maior frequência que indivíduos sem estas condições. Esta evidencia contribuiu para a preocupação e o enfoque na investigação do papel do Citomegalovírus no processo de dano vascular.

O quadro abaixo descreve de forma simplificada os coeficientes de prevalência de recorrência viral já encontradas em outros estudos. No caso de estudos envolvendo indivíduos HIV (+) a prevalência de identificação de viremia variou entre de 22 a 35%. Todos os estudos utilizaram técnicas de reação em cadeia de polimerase (PCR).

Quadro 2: Frequência de detecção de DNAemia pelo Citomegalovírus em estudos com diferentes grupos.

| População e métodos | Reativações do CMV | Referência |
|--|--|--|
| População: Indivíduos adultos criticamente doentes (Unidades de Terapia Intensiva – UTI) Método: RT-PCR; avaliação semanal | N= 53 <u>Detecção viral</u> = 13 (24.5%) | <i>Caston et al⁽⁷⁵⁾</i> |
| População: Indivíduos saudáveis de 25 a 86 anos Método: Droplet digital PCR; avaliação única | N= 44 <u>Detecção viral</u> = 16 (36%) (24% abaixo de 70 anos e 100% acima desta idade) | <i>Parry et al⁽⁷⁶⁾</i> |
| População: Indivíduos com doença arterial coronariana X saudáveis (>60 anos) Método: RT-PCR; avaliação única | <u>Detecção viral:</u> 18 reativações/ 39 indivíduos saudáveis (46,15%) 37 reativações/ 48 indivíduos com doença coronariana aguda (77%) 10 reativações/ 18 indivíduos com doença coronariana estável (55,5%) | <i>Nikitskaya et al⁽⁷⁷⁾</i> |
| População: Indivíduos com doença coronariana (média de 65 anos) e sem a doença (média de 66 anos) na admissão hospitalar Método: RT-PCR | N= 97 com doença coronarina N= 53 saudáveis <u>Detecção viral</u> = CMV em plasma em 77% | <i>Nikitskaya et al⁽⁷⁸⁾</i> |

| | | |
|---|--|--|
| <p>População: Indivíduos HIV (+), média de 35 anos; média de CD4+: 636 (mín. 487,5 – máx. 821)</p> <p>Método: Droplet digital PCR em PBMC; média de 4 avaliações/ indivíduos; intervalos – a cada 6 meses</p> | <p>N= 108</p> <p><u>Detecção viral</u> = 33% das das amostras foram CMV (+); 63% dos participantes tiveram pelo menos 1 amostra detectável</p> | <p><i>Smith et al</i>⁽⁷⁹⁾</p> |
| <p>População: Indivíduos HIV (+) acima de 18 anos com CD4+ < 350 cél/microl</p> <p>Método: RT-PCR; avaliação única</p> | <p>N= 153</p> <p><u>Detecção viral</u> = 53 (35%)</p> | <p><i>Aichelburg et al</i>⁽⁸⁰⁾</p> |
| <p>População: Crianças de 3 semanas a 2 anos de idade (média de 12 meses) HIV (+) e HIV (-) (África Subsaariana)</p> <p>Método: PCR em única avaliação</p> | <p>N= 101 HIV (+) e 191 HIV (-)</p> <p><u>Detecção viral</u> = 54,5% HIV (+); 34% HIV (-)</p> | <p><i>Tembo et al</i>⁽⁸¹⁾</p> |
| <p>População: Crianças HIV (+); até 21 anos; média de idade 7 anos</p> <p>Método: PCR; Avaliação única no início do seguimento</p> | <p>N=67 sorologia (+) para CMV</p> <p><u>Detecção viral</u> = 15 indivíduos (22.40%)</p> | <p><i>Kapetanovic et al</i>⁽⁸²⁾</p> |

Praticamente todos os adultos e ao menos 50% das crianças HIV(+) têm evidência sorológica de infecção pelo CMV. O risco de doença pelo CMV se relaciona diretamente ao nível de células CD4+ do paciente e quanto maior o comprometimento imunológico, maior é esse risco. A recorrência da infecção pelo CMV geralmente ocorre quando o número de células CD4+ se encontra abaixo de 100 células / mm³, podendo ser silente ou desencadear doença com diferentes graus de gravidade, desde quadros breves e autolimitados até quadros graves de alta morbimortalidade⁽⁸³⁾. Os quadros clínicos mais comuns da infecção pelo CMV em pacientes HIV(+) são retinite (corresponde a 85% das doenças graves), colite (10% das doenças pelo CMV nos pacientes com AIDS) e esofagite. As doenças menos comuns são a encefalite, neuropatia periférica, pneumonite, gastrite e hepatite. Em 45 a 60% de adultos com CD4+ inferior a 100 células/mm³ podem ocorrer uma ou mais reativações da infecção pelo CMV ao longo do período de 6 meses a 1 ano⁽⁸⁴⁾⁽⁸⁵⁾, sendo que quanto maior a viremia plasmática, maior o risco de desenvolvimento de doença.

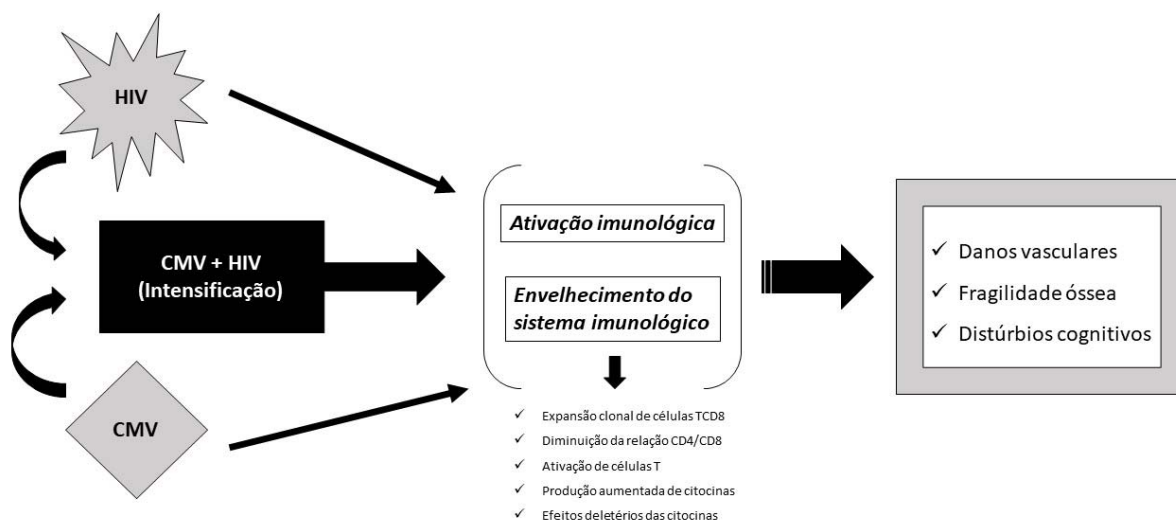
Além do risco de doença associada à imunossupressão, o Citomegalovírus produz infecção crônica latente que resulta em efeitos semelhantes ao vírus HIV na ativação do sistema imunológico e no “envelhecimento precoce” deste. Como já descrito previamente, em indivíduos sem outras condições clínicas o CMV está implicado no processo de envelhecimento e inflamação, associando-se às doenças de maior incidência com o avanço da idade, como a fragilidade óssea, a aterosclerose e distúrbios cognitivos. Em vista disso, o

estudo da coinfeção é alvo de interesse, para avaliação de como estes vírus atuam sinergicamente contribuindo para a ocorrência deste eventos⁽⁸⁶⁾.

Há evidências de que as alterações no sistema imunológico que o Citomegalovírus produz possam influenciar na patogênese da infecção pelo HIV e conseqüentemente na evolução da doença⁽⁸⁷⁾. O CMV pode contribuir para o aumento da replicação viral do HIV e para a infecção de maior número de células que constituem o “reservatório” viral, além de intensificar a ativação imunológica persistente e do processo de envelhecimento do sistema imunológico⁽⁸⁸⁾. Mesmo nos indivíduos com adequado tratamento antirretroviral há aumento da ativação de células T específicas do CMV, maior nível de ativação de células T, proliferação destas e evolução para estágios de diferenciação que caracterizam o “envelhecimento”. Um dos estudos que enfatizaram a importância do CMV nas alterações imunológicas que ocorrem na infecção pelo vírus HIV foi o que demonstrou diminuição do número de células T ativadas com o uso de Valganciclovir, medicação usada no tratamento da infecção pelo CMV⁽⁸⁹⁾. O impacto desta interação é a intensificação dos efeitos deletérios causados por cada um destes vírus⁽⁹⁰⁾. A seguir, listamos os possíveis efeitos do CMV em indivíduos infectados pelo HIV estão⁽⁸⁷⁾:

- O CMV como fator que associa-se ao desenvolvimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), quadro mais avançado da infecção, mesmo em pacientes que iniciaram terapia antirretroviral⁽¹⁶⁾.
- Expansão do número células TCD8+ com grande proporção de células específicas para o CMV.
- Aumento do número de células efetoras TCD8+ com diminuição do número de células *naive*.
- Diminuição da relação de células CD4+/CD8+.
- Predomínio progressivo de células T com menor potencial de resposta e replicação e com produção de citocinas que resultam em inflamação e danos a diferentes sistemas.

Figura 3. Mecanismos envolvidos nos danos causados pela coinfeção HIV/ CMV.



As células T CD8+ citotóxicas têm papel chave na resposta imune ao CMV⁽⁹¹⁾. As proteínas pp65 do CMV (estrutural) e IE1 (Immediate Early 1 – envolvida na reativação viral) são consideradas os maiores alvos da resposta de célula TCD8+ ao CMV⁽⁹²⁾. Os pacientes HIV(+) possuem resposta exacerbada ao CMV com maior número de células CD8+ produzindo IFN gama em resposta a antígenos virais do que pacientes HIV(-)⁽⁹³⁾. Além disso, diversos estudos demonstraram que as células T CD8+ específicas para o CMV estão presentes em maior número em pacientes HIV(+) não tratados e em pacientes em terapia antirretroviral do que naqueles HIV(-)⁽⁹⁴⁾⁽⁹⁵⁾.

A avaliação das células TCD8+, portanto, pode expressar os mecanismos utilizados pelo sistema imunológico para controle da replicação viral do CMV, limitando sua persistência ou prevenindo sua ocorrência. Tanto esta proteção quanto o desenvolvimento de doença por este vírus associam-se à ativação funcional das células T, com a produção de Interferon gama (INFgama)⁽⁹⁶⁾. Portanto, embora estes mecanismos protejam contra o desenvolvimento da doença pelo CMV, contraditoriamente, podem contribuir para a patogênese dos danos não infecciosos que ocorrem na infecção pelo HIV, persistindo mesmo com o amplo tratamento e controle dessa infecção.

Após a introdução da Terapia Antirretroviral (TARV) houve uma queda de aproximadamente 80% dos quadros de retinite pelo CMV e a sobrevivência dos pacientes após esta doença elevou-se em 93%⁽⁹⁷⁾. A ocorrência de viremia plasmática também diminuiu com a introdução do tratamento para a infecção pelo HIV⁽⁹⁶⁾⁽⁹⁸⁾.

Paradoxalmente, a recuperação imune ao CMV pode ser incompleta⁽⁸³⁾⁽⁹⁹⁾, possivelmente influenciada por condições específicas. Esta falha na recuperação pode ser explicada pela persistência de baixo número de células TCD4+ específicas a este vírus e diminuição da atividade das células TCD4+ e TCD8+. Em vista disto, a replicação do CMV ainda pode contribuir para as complicações que ocorrem nos pacientes HIV(+), mesmo após controle total da Carga Viral do HIV.

Em crianças, a coinfeção CMV/HIV pode ocorrer precocemente na transmissão vertical concomitante de ambos os vírus, ou na infecção adquirida posteriormente. O impacto destes diferentes momentos de aquisição da infecção se diferenciam, estando a transmissão vertical associada à maior gravidade, à progressão para AIDS, encefalopatia e morte^(100,101). O uso de Terapia Antirretroviral (TARV) e o adequado controle da infecção pelo HIV reduzem a viremia do CMV e a ocorrência de doenças associadas a este vírus⁽¹⁰²⁾. No entanto, não se conhece se esse vírus continua a contribuir com alterações que se manifestarão em longo prazo, como a aterosclerose, mesmo após a instituição da TARV.

Já existem evidências que as alterações que ocorrem no sistema imunológico de adultos coinfectados podem ocorrer também em crianças e adolescentes. Slyker e colaboradores avaliaram a ativação imune celular em crianças HIV+ na infecção aguda pelo CMV e evidenciaram que a infecção pelo CMV está associada ao aumento desta ativação com a presença de células TCD4+ e TCD8+ HLA-DR+CD38+. O nível de carga viral do HIV possui um efeito sinérgico com o CMV no aumento da ativação celular, porém a ativação específica das células TCD8+ se associou à coinfeção CMV+/HIV+ e a viremia plasmática do CMV (DNAemia), mas não se associou ao nível de carga viral do HIV⁽¹⁰⁰⁾.

Bekker e colaboradores demonstraram o aumento de células TCD8+ CD45+RA+CD27- (efetoras) em crianças com coinfeção HIV/CMV em relação a crianças HIV (+) sem infecção pelo CMV. Esta diferença persistiu mesmo após o uso de terapia antirretroviral e apresentou associação direta com a presença de excreção do CMV na urina nos pacientes CMV (+). Os marcadores de ativação de células T HLA-DR+CD38+ também foram avaliados e se encontravam aumentados na avaliação inicial dos pacientes com coinfeção HIV/CMV, mas com uso das medicações antirretrovirais a diferença em relação aos pacientes sem coinfeção não persistiu, evidenciando que esta ativação estivesse associada não somente à infecção pelo CMV, mas também à infecção pelo HIV⁽¹⁰³⁾. A baixa produção de IFN- γ também foi observada em crianças HIV(+), mesmo com uso de TARV.

Embora existam evidências de que alterações semelhantes a observadas em adultos podem ocorrer nesta coinfeção em crianças e adolescentes, há estudos que sugerem que esta interação produza efeitos diferentes do Citomegalovírus no sistema imunológico. Furman e colaboradores⁽¹⁰⁴⁾ demonstraram que os efeitos do CMV em idades mais jovens podem até ser benéficos ao funcionamento do sistema imunológico, explicando a persistência desta infecção por muitos anos na humanidade.

Enfim, é necessário dar o enfoque à população de crianças e adolescentes para a compreensão das complicações em longo prazo que a infecção pelo HIV pode causar. Somente assim será possível compreender melhor o momento em que os fatores que as influenciam tem maior impacto e planejar as estratégias de cuidado destes indivíduos visando a sua prevenção.

2. MÉTODOS

2.1. Hipótese

A detecção de indicadores de recorrência ou ativação imune específica da infecção pelo Citomegalovírus (CMV), ao longo de dois anos, em crianças e adolescentes com infecção pelo vírus HIV (HIV+) está associada ao aumento da espessura da íntima e média da artéria carótida (cIMT), um marcador de alterações precoces da aterosclerose.

2.2. Objetivos

2.2.1. Objetivos Principais

- a) Avaliar se a recorrência da infecção pelo CMV identificada pela detecção sérica do DNA viral associa-se ao aumento da espessura da íntima e média da artéria carótida em adolescentes infectados pelo HIV, ao longo de dois anos;
- b) Avaliar se a presença ou a magnitude da resposta imune à infecção pelo Citomegalovírus associa-se ao aumento da espessura da íntima e média da artéria carótida (cIMT) em adolescentes infectados pelo HIV, ao longo de dois anos;
- c) Avaliar se a magnitude da ativação imunológica de células T e monócitos, por meio da quantificação de receptor I do TNF solúvel (sTNFR1), molécula de CD14 solúvel (sCD14) e expressão de HLADR⁺CD38⁺, associam-se ao aumento da espessura da íntima e média da artéria carótida (cIMT) em adolescentes infectados pelo HIV, ao longo de dois anos.

2.2.2. Objetivos Secundários

- a) Avaliar a evolução da espessura da íntima/média das artérias carótidas em pacientes com infecção pelo HIV durante o período de 2 anos;
- b) Avaliar a frequência de recorrência da infecção (reativações ou reinfecções) pelo Citomegalovírus em crianças e adolescentes infectados pelo HIV.

2.3. População de estudo

O serviço de Infectologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (HCRP – USP) é a referência para o seguimento das crianças e adolescentes com infecção pelo vírus HIV procedentes dos municípios que compõem a direção regional de saúde XIII (DRS XIII), recebendo eventualmente indivíduos

provenientes de outras regionais. O presente estudo foi desenvolvido nesta população, sendo todas as crianças e adolescentes entre 10 anos e 17 anos e 11 meses elegíveis convidadas a participar, constituindo uma amostra de conveniência, considerando a existência de poucos dados na literatura a respeito da recorrência pelo CMV nesta faixa etária. O grupo de participantes foram submetidos às avaliações do estudo ao longo dos 2 anos de seguimento, e a identificação dos indivíduos com presença de recorrência viral e ativação imune específica a este vírus em relação aqueles que não apresentassem estas características visou a concretização da análise dos objetivos principais.

Os seguintes foram os critérios de inclusão:

- a) Possuir idade entre 10 e 17 anos e 11 meses anos na primeira avaliação.
- b) Ter infecção pelo HIV documentada, adquirida por transmissão vertical ou outra forma: crianças com confirmação da infecção por exames virológicos (menores de 18 meses) ou sorológicos (maiores de 18 meses) segundo as diretrizes definidas no Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em crianças e adolescentes⁽¹⁰⁵⁾;
- c) Ser infectado pelo CMV, identificado por meio de teste sorológico de detecção de anticorpos IgG anti-CMV positivo quando da entrada no estudo;
- d) Ser capaz de ser submetido ao exame de ultrassonografia para avaliação da medida da espessura da íntima/média das artérias carótidas;
- e) Pai, mãe ou responsável legal serem capazes de assinar o termo de consentimento para participação da criança/adolescente no estudo;
- f) Não ser portador de Diabetes Mellitus (definida por glicemia de jejum > 126mg/dl ou em qualquer momento > 200mg/dl);
- g) Não ser portador de Hipertensão Arterial (pressão arterial sistólica ou diastólica acima do percentil 95 de acordo com o sexo e percentil de estatura, comparativamente à referencia padrão⁽¹⁰⁶⁾);
- h) Não possuir o hábito de fumar (uso habitual de cigarro em qualquer frequência).
- i) Não estar recebendo tratamento medicamentoso para a infecção pelo CMV no início do estudo;
- j) Ser capaz de aderir aos procedimentos do estudo;
- k) Não estar em uso de corticosteroides em doses imunossupressoras: 2mg/kg/dia por mais de 15 dias;

- l) Não estar em uso outras medicações imunomoduladoras (ex: Interferon).

2.4. Desenho de Estudo

Estudo clínico longitudinal, observacional e analítico no qual crianças e adolescentes coinfetados pelo HIV e CMV foram acompanhados ao longo de 2 anos. As avaliações previstas no estudo visaram caracterizar os indivíduos inicialmente e ao longo do seguimento quanto a evolução da infecção pelo vírus HIV e condições de saúde. Todos os participantes foram submetidos a avaliações médico-laboratoriais rotineiras e periódicas, com evolução clínica e quantificação de linfócitos CD4+/CD8+ e de RNA-HIV realizadas a cada 3 meses. Em todas as visitas do estudo foi realizada a revisão dos dados clínicos do participante quanto à ocorrência de doenças infecciosas e recebimento de vacinação no intervalo das avaliações. Nesta mesma periodicidade foi incluída a avaliação da recorrência sérica da infecção pelo citomegalovírus, pela técnica de reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR) para análise do objetivo principal.

A cada 6 meses, os participantes foram submetidos a avaliação clínica com o objetivo de caracterizar a presença de outros fatores de risco cardiovascular, com obtenção de medidas antropométricas de peso, estatura, índice de massa corporal (IMC), medida da pressão arterial e medida da circunferência abdominal, além da avaliação do estadiamento puberal. Nesta mesma periodicidade foram realizadas as análises laboratoriais de glicemia e perfil lipídico (colesterol total, triglicérides, LDL – colesterol e HDL – colesterol) . Na última avaliação do estudo, 24 meses após o início, foi incluída a dosagem de insulinemia de jejum para cálculo do Índice HOMA-IR (*homeostasis model assesment*) e dosagem da Hemoglobina glicosilada, como indicadores de possível alteração do metabolismo da glicose.

Os marcadores de imunidade específica ao CMV (dosagem de IgM e IgG e ativação imune de células TCD8+ – QuantiFERON-CMV) também foram avaliados semestralmente, assim como os marcadores de ativação imune inespecíficos (receptor I do TNF solúvel – sTNFR1, molécula de CD14 solúvel – sCD14 e expressão de HLADR⁺CD38⁺ na citometria de fluxo).

A avaliação da espessura das camadas íntima e média das artérias carótidas foi realizada no início do seguimento, ao final de 12 meses e ao final dos 24 meses, como indicador de alterações vasculares precoces associadas ao desenvolvimento de aterosclerose.

O Quadro 3 apresenta o Cronograma de Avaliações previstas no estudo. O detalhamento das avaliações e os seus fundamentos estão apresentados a seguir.

Quadro 3. Cronograma de Avaliações dos participantes do estudo

| Avaliação | Inicial | 3 meses | 6 meses | 9 meses | 12 meses | 15 meses | 18 meses | 21 meses | 24 meses |
|--|---------|---------|---------|---------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Medidas antropométricas: peso, estatura, IMC ¹ , PA ² , circunferência abdominal; estadiamento puberal | X | | X | | X | | X | | X |
| Perfil lipídico e Glicemia de jejum | X | | X | | X | | X | | X |
| Quantificação de carga viral do HIV/ Citometria (quantificação de células CD4+ e CD8+) e revisão de dados clínicos | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| RT-PCR para o CMV sérico | X | X | X | X | X | X | X | X | X |
| Avaliação da imunidade celular ao CMV (Quantiferon ^R) e Nível de Anticorpos específicos para CMV (IgG e IgM) | X | | X | | X | | X | | X |
| Marcadores de ativação da imunidade inespecífica (sTNFR1, sCD14, TCD8+HLADR ⁺ CD38 ⁺) | X | | X | | X | | X | | X |
| Ultrassonografia - Espessura da Íntima-Média da Carótida (cIMT) | X | | | | X | | | | X |

* Aos 24 meses foi incluída a insulinemia de jejum para cálculo do índice HOMA-IR e a dosagem de Hemoglobina glicosilada.

1- Índice de massa corporal; 2- Pressão arterial

2.4.1. Avaliações clínicas

2.4.1.1. Dados clínicos iniciais e de seguimento

O prontuário médico dos participantes foram revisado para obtenção de dados referentes ao diagnóstico e tratamento da infecção pelo HIV e sobre a história prévia de infecção e tratamento de doença pelo citomegalovírus. Foram registrados:

a) Idade: definida em anos completos na entrada no estudo;

b) Sexo: masculino / feminino;

c) História clínica da infecção pelo vírus HIV e evolução:

- Classificação clínica e imunológica da infecção segundo o critério do *Center for Disease Control* (CDC) adaptado pelo Ministério da Saúde ⁽¹⁰⁵⁾:foi obtida a classificação inicial no momento da entrada e avaliado se houve modificação durante o seguimento.
- Classificação clínica e imunológica segundo a Organização Mundial da Saúde⁽¹⁰⁷⁾: foi obtida a classificação inicial e avaliado se houve modificação durante o seguimento.
- História de uso de antirretrovirais (ARV): Identificadas as classes de antirretrovirais que o indivíduo já havia utilizado, estava em uso ou passou a utilizar, especificando de quais medicamentos se constituía cada esquema (Inibidores da transcriptase reversa análogos nucleosídeos (ITRN)/ Nucleotídeos (ITRNt), Inibidores da Transcriptase Reversa não análogos nucleosídeos (ITRNN), Inibidores de protease (IP), Inibidores da Integrase (Raltegravir), Inibidor de fusão (Enfuvirtida) e Antagonista do receptor CCR5 (Maraviroc).
- Nadir de quantificação de células CD4+: obtido o menor valor do número de células CD4+ e da porcentagem de células apresentado pelo indivíduo previamente à entrada no estudo.
- História clínica de infecção ou imunização obtidos a cada 3 meses, para avaliação das intercorrências ocorridas nos intervalos entre as avaliações do estudo.

d) História de doença pelo Citomegalovírus:

- História de doença prévia pelo Citomegalovírus e o tipo de doença apresentado foram obtidos na entrada, além do registro se o indivíduo havia previamente realizado tratamento específico para a doença pelo Citomegalovírus ou recebido profilaxia para esta infecção.

e) História familiar de risco cardiovascular:

- Definida pela presença de familiar de primeiro grau ou segundo grau do sexo masculino com idade abaixo dos 55 anos ou do sexo feminino com idade abaixo dos 65 anos com doença cardiovascular associada à aterosclerose (ataque cardíaco, angina tratada, indivíduo submetido a procedimento de cateterismo, realização de cirurgia de revascularização coronária, acidente vascular cerebral ou morte súbita de causa cardíaca)⁽¹⁸⁾.

2.4.1.2. Avaliações antropométricas:

a) Peso: definido em gramas, por meio da medida em balança digital com precisão de 100 gramas; as crianças e adolescentes foram pesados com roupas leves e sem sapatos.

b) Estatura: definida em cm, por meio de estadiômetro com precisão de um milímetro. A criança ou adolescente posicionou-se de pé com os pés descalços e unidos tocando o aparelho com os calcanhares, as cinturas pélvica e escapular e a região occipital, sendo obtido a medida do ponto mais alto da cabeça nesta posição. Para definição do percentil de estatura correspondente a cada medida foi utilizada a curva de referência do NCHS (*National Center for Health Statistics - CDC*)⁽¹⁰⁸⁾. Os indivíduos foram classificados segundo os seguintes percentis: 5, 10, 25, 50, 75, 90 e 95. Para as medidas que se encontravam em valores intermediários de percentis foram utilizados aqueles que mais se aproximavam do obtido.

c) Índice de Massa corporal: definido por meio do cálculo: (peso (em quilogramas)) ÷ (estatura (em metros))². Para definição do percentil de cada indivíduo em relação à população de referência foi utilizada a curva do NCHS – CDC⁽¹⁰⁸⁾. Os indivíduos foram classificados como apresentado no Quadro a seguir⁽¹⁰⁹⁾:

Quadro 4. Classificação das crianças de acordo com o índice de massa corporal (IMC)

| IMC | Classificação* |
|------------------------|----------------|
| Abaixo do p10 | Magreza |
| Entre p10 e p85 | Eutrofia |
| Entre p85 e p99 | Sobrepeso |
| Acima do p99 | Obesidade |

Fonte: Sociedade Brasileira de Pediatria, 2009. *Avaliação Nutricional da Criança e do Adolescente – Manual de orientação.*

d) Medida da circunferência abdominal: obtida com a mesma fita métrica por meio da medida da linha da cintura, no ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca. Foram utilizados os valores de referência de Freedman et al⁽¹¹⁰⁾, para caracterização das medidas classificadas como de risco (acima do valor correspondente ao percentil 90 para o sexo e idade) ou fora do risco (abaixo do percentil 90).

e) Pressão arterial: aferida com a criança sentada com o braço posicionado na altura do coração. A aferição foi feita com esfigmomanômetro digital, tendo sido utilizado um manguito que cobrisse 2/3 do comprimento do braço. Para classificação de pressão arterial elevada (igual ou acima do percentil 90) ou dentro dos limites de normalidade (abaixo do percentil 90), utilizaram-se as tabelas de referência para sexo, idade e percentil de estatura do NCHS – CDC⁽¹⁰⁶⁾.

2.4.1.3. Estadiamento puberal

O estadiamento puberal foi obtido por meio do exame físico do adolescente, sendo classificado segundo a referência de estadiamento de Tanner, recomendado nas Recomendações para terapia antirretroviral em crianças e adolescentes infectados pelo HIV⁽¹⁰⁵⁾. Nas meninas foram avaliadas as mamas e classificadas de M1 a 5, assim como os pelos pubianos de P1 a 5. Nos meninos foram avaliados o escroto e testículos para definição de G1 a 5 e os pelos pubianos de P1 a 5.

2.4.2. Avaliações laboratoriais

2.4.2.1. Avaliação laboratorial de fatores de risco cardiovascular

As alterações laboratoriais associadas ao dano cardiovascular são as alterações de lipoproteínas séricas e do metabolismo da glicose que caracterizam o diabetes. As seguintes foram as avaliações realizadas para identificar estas alterações nos participantes do estudo.

a) Glicemia de jejum: Feita por meio do método enzimático no Laboratório de Bioquímica do Hospital das Clínicas da FMRP-USP. Resultados < 100mg/dl foram definidos como normais para os indivíduos até 17 anos, sendo valores entre 100 e 126 mg/dl classificados como alterados⁽¹⁰⁹⁾.

b) Hemoglobina glicosilada: medida através do método HPLC – cromatografia líquida de alta performance no Laboratório de Endocrinologia - Metabologia do Hospital das Clínicas da

FMRP-USP, obtendo valores em % de HBA1C. Valores abaixo de 5,7% são considerados normais, entre 5,7 e 6,4% são definidos como alto risco de diabetes e igual ou acima de 6,5% como diabetes, sendo necessário ter 2 resultados acima deste valor para o diagnóstico⁽¹¹¹⁾.

c) Insulinemia de jejum para cálculo do índice HOMA-IR (*homeostasis model assesment of insulin resistance*): Foi obtida a dosagem de insulinemia de jejum pelo método de quimioluminescência realizadas no Laboratório de Bioquímica do Hospital das Clínicas da FMRP-USP, com resultados expressos na unidade de microUI/ml. Para cálculo do índice os valores de glicemia de jejum de mg/dl foram convertidos para mmol/l, tendo sido utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{HOMA IR} = (\text{insulinemia de jejum (microUI/ml)} \times \text{glicemia de jejum (mmol/l)}) / 22,5$$

Valores até 2,5 foram considerados normais e acima deste valor foram considerados alterados⁽¹¹¹⁾.

d) Perfil lipídico: consistiu na determinação dos valores de colesterol total (CT), HDL-colesterol, Triglicerídeos (TG) e LDL-colesterol realizadas no Laboratório de Bioquímica do Hospital das Clínicas da FMRP-USP. As dosagens de CT, HDL-colesterol e TG foram realizadas usando método enzimático e o LDL-colesterol foi calculado utilizando-se a fórmula de Friedewald quando os níveis de triglicerídeos eram inferiores a 400mg/dl ($\text{LDL} = \text{CT} - (\text{HDL} + (\text{TG}/5))$). Os resultados foram fornecidos em mg/dl e foram avaliados de acordo com as referencias de normalidade para crianças e adolescentes com idade entre 10 e 19 anos, conforme o quadro apresentado a seguir⁽¹⁸⁾.

Quadro 5. Valores limites para colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol e Triglicerídeos utilizados para classificação dos participantes no estudo.

| Teste laboratorial | Aceitável (em jejum)* |
|-------------------------|-----------------------|
| Colesterol total | < 170 mg/dl |
| HDL – colesterol | > 45 mg/dl |
| LDL – colesterol | < 110 mg/dl |
| Triglicerídeos | < 90mg/dl |

Fonte: *Expert Panel on Integrated Guidelines for Cardiovascular Health and risk reduction in children and adolescents*⁽¹⁸⁾.

2.4.2.2. Avaliação da evolução do tratamento da infecção pelo vírus HIV

a) Quantificação da Carga Viral do HIV: realizada no Laboratório de Sorologia do Hospital das Clínicas da FMRP-USP, pelo método de reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR) para quantificação do RNA do vírus HIV por meio do ensaio comercialmente disponível

REAL TIME ABBOT^R, cujo limite de detecção do teste é 40 cópias/ml. Os indivíduos foram classificados de acordo com a viremia identificada conforme o Quadro 6⁽¹⁰⁵⁾.

Quadro 6. Valores limites de viremia para classificação dos participantes segundo o controle virológico da infecção pelo HIV.

| Valores | Classificação |
|--|---|
| Abaixo do limite de detecção (<40 cópias/ml) | <i>Controle virológico da infecção pelo HIV*</i> |
| Entre 40 e 400 cópias/ml | |
| De 400 a 1.000 cópias/ml | <i>Sem controle virológico da infecção pelo HIV</i> |
| De 1.000 a 10.000 cópias/ml | |
| De 10.000 a 100.000 cópias/ml | |
| Acima de 100.000 cópias/ml | |

Fonte: Recomendações para terapia antirretroviral em crianças e adolescentes infectados pelo HIV, 2009⁽¹⁰⁵⁾.

b) Quantificação do número de células CD4+ e CD8+: realizado pelo método de Citometria de Fluxo no Laboratório de Citometria de Fluxo do Hemocentro de Ribeirão Preto, com obtenção dos valores absolutos do número de células/mm³ e a porcentagem do total de linfócitos (células TCD3⁺). Os resultados de cada avaliação foram também apresentados de acordo com a classificação imunológica dos critérios do CDC⁽¹⁰⁵⁾, conforme apresentado no Quadro 7.

Quadro 7. Classificação imunológica de criança infectadas pelo HIV, segundo valores absolutos e relativos de células CD4+.

| Alteração imunológica | Valores absolutos de Células CD4+ | Valores relativos de Células CD4+ |
|-----------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Ausente | Acima de 500 /mm ³ | Acima de 25% |
| Moderada | Entre 200 e 500 / mm ³ | Entre 15 e 25 % |
| Grave | Abaixo de 200 / mm ³ | Abaixo de 15% |

Fonte: Recomendações para terapia antirretroviral em crianças e adolescentes infectados pelo HIV, 2009⁽¹⁰⁵⁾.

2.4.2.3. Marcadores inespecíficos de ativação imunológica

A infecção pelo HIV conduz a um estado de ativação imunológica permanente mesmo nos indivíduos que apresentam controle da infecção, como apresentado previamente. Com o intuito de avaliar o grau de ativação imunológica das crianças e adolescentes participantes do estudo foram utilizados os ensaios descritos a seguir.

a) Identificação de células TCD8+HLADR⁺CD38⁺

As células TCD8⁺ em estágios avançados de ativação expressam em sua superfície as moléculas HLA-DR e CD38. A presença destas moléculas caracteriza a ativação imune celular e estão presentes em pacientes infectados pelo HIV, como parte da estimulação imune persistente que ocorre nesta infecção, mesmo em pacientes com controle adequado da replicação viral⁽¹¹²⁾.

Foram utilizados anticorpos monoclonais anti-CD3, anti-CD8, anti-HLA-DR e anti-CD38 com marcadores imunofluorescentes para identificação das células por citometria de fluxo (FACScount, BDBioscience). Estes anticorpos são misturados ao sangue total e incubados conforme determinação do fabricante, após adicionar a solução (*FACS Lysing solution*) que permite a emissão fluorescente dos marcadores. Após este procedimento inicial, as amostras foram analisadas com o software Cell Quest possibilitando a obtenção dos valores absolutos e de porcentagem do grupo de células desejada de acordo com a captação do fluxo e emissão de fluorescência de cada marcador.

Foram obtidos os valores de células com os seguintes padrões de expressão: HLADR⁻CD38⁻; HLADR⁺CD38⁻; HLADR⁻CD38⁺; HLADR⁺CD38⁺. A porcentagem de células com este último padrão de expressão representará os níveis de linfócitos T ativados para a análise do objetivo principal do estudo. As medidas foram realizadas no Laboratório de Citometria de Fluxo do Hemocentro de Ribeirão Preto.

b) Quantificação de receptor de TNF I solúvel (sTNFR I)

As células T ativadas expressam receptores de TNF, entre eles o TNFR tipo I que é liberado no plasma após a ativação celular, sendo possível realizar sua quantificação. A avaliação foi realizada com a técnica de ensaio imunoenzimático tipo sanduíche (ELISA) para identificação e quantificação do sTNFR I (R&D) em amostras de plasma. Foram obtidos resultados quantitativos em ng/ml. Em linhas gerais, o princípio do método consiste na aplicação dos controles e das amostras de plasma dos participantes nos poços da placa e o sTNFR I presente se ligará aos anticorpos fixos presentes nestes locais. Após lavagem e incubação são adicionados anticorpos policlonais específicos contra sTNFR I ligados a enzimas. Após este processo nova lavagem é realizada para eliminar os complexos de anticorpo – enzima não ligados às moléculas e os substratos são adicionados a placa. A emissão de cor,

após adicionar o substrato, corresponde à concentração de moléculas de sTNFRI presentes na amostra e ligadas na placa no processo inicial. É adicionado reagente para estabilizar a emissão de cor para ser feita a sua medida. De acordo com o padrão de emissão colorida dos padrões e as concentrações previamente conhecidas destes são determinados os valores de sTNFRI para cada amostra. As medidas foram realizadas no Laboratório de Pediatria do Hospital das Clínicas da FMRP-USP.

c) Quantificação do marcador de ativação de monócitos solúvel sCD14:

A molécula CD14 é expressa na membrana dos monócitos e macrófagos e é sítio de ligação das moléculas LPS presentes na parede celular de bactérias. Uma vez que essas células sejam ativadas, ocorre a liberação do CD14 solúvel (sCD14). A presença do sCD14 é, portanto, indicativa de ativação destas linhagens celulares.

A quantificação de sCD14 foi realizada no Laboratório de Pediatria do Hospital das Clínicas da FMRP-USP, em amostras de plasma pela técnica de ELISA utilizando-se um ensaio comercialmente disponível (R&D Systems). Trata-se de ensaio imunoenzimático (ELISA) tipo sanduíche para identificação e quantificação do sCD14. Foram obtidos resultados quantitativos em ng/ml no plasma das amostras dos participantes do estudo. O princípio do método é o mesmo descrito para o sTNFRI anteriormente.

2.4.2.4. Recorrência da infecção pelo citomegalovírus

A detecção do DNA do citomegalovírus por meio da metodologia de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) é o método padrão ouro para determinar a ocorrência de viremia plasmática, já que identifica a presença do próprio vírus na corrente sanguínea. A extração de DNA das amostras de sangue e das células mononucleares de sangue periférico (PBMC), quando aplicável, foram realizadas utilizando o *PureLink Genomic DNA Mini Kit*. A quantificação do DNA viral foi realizada utilizando o *CMV Q – PCR Alert Kit^R* (*Nanogen Advanced Diagnostic S.P.A.*), seguindo as especificações de uso do produto.

Nos primeiros seis meses de desenvolvimento do estudo a avaliação da ocorrência de viremia (DNAemia) foi feita por meio do teste de Antigenemia para CMV, tendo sido optado por esta técnica inicialmente por seu menor custo e sua sensibilidade e reprodutibilidade para detecção viral. No entanto, após este período, foi optado pela utilização da técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) em tempo real por esta ter uma metodologia padronizada

com menor risco de obtenção de resultados inadequados. A análise da DNAemia foi realizada nas amostras de PBMC congeladas de pacientes que haviam realizado a análise de antigenemia na visita inicial e de 6 meses. Não foi possível realizar a análise de PCR para os pacientes com antigenemia realizada na visita de 3 meses devido à indisponibilidade de material. Todos os exames em que foram utilizadas ambas as técnicas resultaram negativos, demonstrando concordância entre os métodos.

A avaliação da Antigenemia para o CMV foi realizada com sangue fresco, com as células do sangue periférico separadas por meio de hemossedimentação com solução de dextran 2,5%, citocentrifugadas e fixadas em 2 lâminas, na concentração de 300.000 células/spot. Estas foram incubadas com anticorpo monoclonal contra o antígeno pp65, posteriormente incubadas com anticorpo conjugado com peroxidase contra IgG, lavadas e incubadas com o AEC (3-aminoetilcarbazole), para então serem coradas com hematoxilina e montadas para realização da leitura em microscópio óptico.

2.4.2.5. Marcadores de ativação da imunidade específica ao citomegalovírus

a) Concentração de anticorpos IgG e IgM contra o CMV sanguíneos

A técnica utilizada foi ELISA pelo método de quimioluminescência usando-se o kit comercial Liaison (Diasorin) a qual fornece resultados em UI/ml, unidade com padronização universal.

A fim de classificar os indivíduos de acordo com a ocorrência de aumento de títulos de anticorpos IgG acima de um valor basal foi calculada a razão entre o valor máximo obtido ao longo do seguimento e o valor mínimo. Aqueles com razão acima de 4 possivelmente tiveram estimulação antigênica para o aumento da produção de anticorpos.

b) Ativação da imunidade de células TCD8+ específica para o CMV com a produção de IFN-gama após estímulo antigênico (QuantiFERON-CMV^R):

Existem diferentes técnicas para avaliação funcional da imunidade específica contra o CMV. No entanto, a única que se encontra padronizada e em uso na prática clínica e para pesquisa é o QuantiFERON-CMV^R(Cellestis, Qiagen)⁽¹¹³⁾. Neste ensaio são utilizados uma ampla variedade de Antígenos do CMV (peptídeos sintéticos) que se ligam a epítomos das células TCD8+ e alelos HLA de classe I. São utilizados 20 haplótipos de HLA tipo I (A1, A2, A3, A11, A23, A24, A26, B7, B8, B27, B35, B40, B41, B44, B51, B52, B57, B58, B60 e Cw6 (A30,

B13) que correspondem a 98% dos alelos presentes na população mundial, o que estende a aplicabilidade do exame a diferentes grupos populacionais.

O sangue total é colocado em tubos de coleta específicos (um controle positivo, um controle negativo e um específico do CMV), levemente agitado e posteriormente incubado por 16 a 24 horas a 37°C. Neste período, o estímulo antigênico fará com que células TCD8+ específicas para o CMV produzam e liberem Interferon gama (IFN- γ). Após incubação é feita centrifugação para separação do plasma e a quantificação do IFN é realizada por meio da técnica de ELISA, utilizando Software específico.

A quantificação da presença de IFN- γ acima de 0,2UI/ml na estimulação com o CMV em relação ao controle negativo define o resultado como REATIVO (CMV-controle negativo \geq 0,2 UI/ml). A presença de diferença abaixo deste valor define o resultado como NÃO REATIVO. Para considerar os resultados obtidos o controle positivo deve apresentar diferença em relação ao controle positivo acima de 0,5UI/ml. Caso a esta diferença esteja abaixo deste limite o resultado é definido como INDETERMINADO. O quadro abaixo resume a interpretação do teste.

Quadro 8. Interpretação do resultado de QuantiFERON-CMV.

| CMV – controle (-) | controle (+) – controle (-) | Resultado do QuantiFERON-CMV |
|--------------------|-----------------------------|------------------------------|
| <0,2 UI/ml | \geq 0,5 UI/ml | NÃO REATIVO |
| \geq 0,2 UI/ml | Qualquer resultado | REATIVO |
| <0,2 UI/ml | <0,5 UI/ml | INDETERMINADO |

Fonte: In QuantiFERON CMV *Package Insert*.

2.4.2.6. Avaliação da Espessura da camada íntima/média das artérias carótidas

Para a avaliação do dano cardiovascular foi utilizada a medida ultrassonográfica da espessura da camada íntima/média das artérias carótidas. A partir da análise das referências científicas para medida de IMT, foi elaborado protocolo específico para este estudo, descrito detalhadamente abaixo. As medidas foram realizadas por ultrassonografistas, médicos especialistas em diagnóstico por imagem e avaliadas utilizando software específico *Auto-IMT LogicE9 (GE)*. A obtenção da medida foi completamente automatizada.

Para o exame o pescoço do sujeito foi discretamente estendido com a cabeça voltada cerca de 45 graus para o lado oposto ao examinado. As artérias carótidas comuns direita e

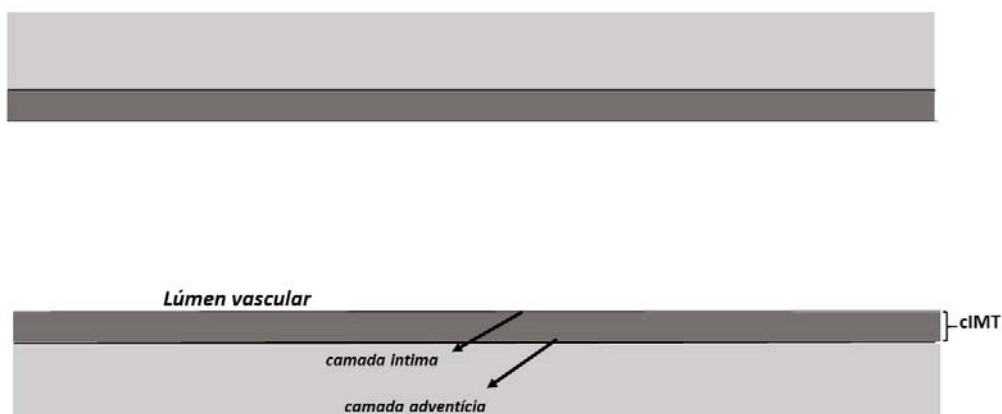
esquerda foram visibilizadas em um plano longitudinal perpendicular ao plano de insonação para melhor identificação da camada mediointimal distal.

O ultrassonografista era cego para as características do participante. Os exames foram realizados em ambiente de baixa luz, após 10min de repouso em decúbito dorsal. Foi utilizada sonda linear de alta frequência LA435 (6 a 18 MHz), com foco de no máximo 30 mm de profundidade e com número de repetições por segundo em 115Hz (“frame rate”). O ganho⁽¹¹⁴⁾ e o plano anterior ou lateral de avaliação foram adequados para a melhor resolução da imagem no modo B, com intuito de reduzir os artefatos intraluminais, de acordo com a experiência do observador.

A carótida comum, a bifurcação e a carótida interna eram inicialmente identificadas e rastreadas para a identificação da presença de placas. Posteriormente era realizada a visualização longitudinal da artéria até que as camadas íntima e média pudessem ser visualizadas na parede anterior e posterior da carótida. A medição foi realizada na parede posterior, conforme recomendação, ao longo de 10mm de extensão após a bifurcação, na artéria carótida comum. O eletrocardiograma simultâneo realizado pelo aparelho possibilitou a medição ao final da diástole. Foram obtidas 3 medidas de cada lado e a média destas medidas constituiu o valor final para cada um dos lados analisados.

Não foi realizada avaliação da variabilidade intraobservador nem interobservador. No entanto, o uso de método padronizado, com técnica totalmente automatizada, sendo a análise final das medidas realizada com as imagens gravadas e pelo mesmo ultrassonografista, diminuem o risco de variabilidade das medidas realizadas. A obtenção de 3 medidas em cada um dos lados avaliados para a obtenção da média, a qual foi utilizada como medida final, aumenta a reprodutibilidade das medidas.

Figura 4. Representação esquemática da medida da espessura das camadas íntima e média da artéria carótida (cIMT).



2.5. Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da FMRP – USP (processo HCRO nº 8562/2013). Foram obtidos os Termos de Assentimento para os participantes e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para pais e responsáveis antes dos indivíduos iniciarem o seguimento no estudo. Estes termos se encontram em anexo.

2.6. Coleta de dados

Os dados do estudo foram coletados e gerenciados usando as ferramentas eletrônicas de captura de dados REDCap hospedadas na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP⁽¹¹⁵⁾. O REDCap (Research Electronic Data Capture) é um aplicativo seguro projetado para suportar captura de dados para estudos de pesquisa, fornecendo 1) uma interface intuitiva para entrada de dados validada; 2) trilhas de auditoria para rastreamento de manipulação de dados e procedimentos de exportação; 3) procedimentos automatizados de exportação para downloads de dados contínuos para pacotes estatísticos comuns; e 4) procedimentos para importar dados de fontes externas. Os instrumentos de coleta de dados se encontram em anexo.

2.7. Análise de dados

Inicialmente, foi feita uma análise exploratória dos dados obtidos em todos os participantes, com a caracterização da população estudada e da evolução das suas características clínicas e laboratoriais durante o período de seguimento. Foram descritas, ao longo do tempo, as variáveis de ativação da imunidade celular específica e inespecífica, de recorrência da reativação viral e de características ultrassonográficas arteriais.

A taxa de incidência de recorrências da infecção pelo CMV foi calculada com relação a indivíduos/mês, considerando-se que nem todos os indivíduos foram observados em todos os momentos planejados.

As medidas ultrassonográficas foram analisadas tanto com os valores absolutos das medidas quanto por meio do cálculo dos escores z. Para a determinação do escore z das medidas ultrassonográficas de cIMT foi utilizado o método *Least Minimum Square* (LMS) de Cole e Green a partir dos valores de mediana, coeficiente de variação e da medida da assimetria, suficientes para a obtenção destes⁽¹¹⁶⁾, com os valores de referência de Doyon e colaboradores⁽³⁴⁾ para sexo e estatura. A utilização de duas abordagens de análise foi proposta, pois, a referência de normalidade dos valores de cIMT por idade e estatura foi obtida de uma população que não possui as mesmas características étnicas e epidemiológicas do grupo populacional que será estudado. Portanto, as duas análises permitiram uma avaliação dos dados obtidos considerando a limitação das referências de cIMT disponíveis na literatura até o momento.

Para se comparar os valores médios das variáveis de interesse (cIMT) entre os dois momentos da observação (entrada e 24 meses), foram ajustados modelos lineares de efeitos mistos, que levam em conta a variabilidade intra-individual, tanto simples (considerando-se apenas o tempo como variável independente) quanto múltiplos (considerando-se o tempo como variável independente e idade, estatura e estadiamento puberal como covariáveis, exceto para o escore z, para o qual foi considerado somente o estadiamento – classificado como impúbere/ em desenvolvimento/ maturação completa).

Para a análise do objetivo principal do estudo foram definidas as seguintes variáveis:

– Variáveis dependentes (medidas de cIMT): foram analisadas utilizando diferentes formas de definição, tendo em vista as limitações da referência de valores de normalidade utilizadas e as dificuldades ainda encontradas na definição do padrão de alteração esperado em um seguimento longitudinal na faixa etária estudada.

- razão (24 meses/Entrada) x 100%;
- diferença ($\Delta = 24 \text{ meses} - \text{Entrada}$) dos valores absolutos e dos escores z de cIMT;
- evolução da medida em relação ao percentil 75 de espessura da cIMT para sexo e estatura segundo Doyon et al:

- *Acima do P75*: inclui aqueles que mantiveram valores acima do P75 em todo o período de seguimento e os que evoluíram no seguimento de um valor abaixo para um acima deste limite.
 - *Abaixo do P75*: inclui aqueles que mantiveram valores abaixo do P75 em todo o período de seguimento e os que evoluíram de um valor acima para um abaixo deste limite.
- Variáveis independentes:
- *contínuas*:
 - média dos níveis de sTNFR1;
 - média dos níveis de sCD14;
 - média da porcentagem de HLADR⁺CD38⁺;
 - média da quantificação da produção de interferon alfa no ensaio de QuantiFERON-CMV.
 - *categóricas*:
 - razão dos níveis de IgG para o CMV (razão entre o nível mais elevado encontrado ao longo do estudo e o nível mais baixo) (<4 ou ≥4);
 - resultado qualitativo de QuantiFERON CMV (Reativo/ Não reativo);
 - carga viral HIV (manutenção de controle virológico: carga viral até 400 cópias/ml durante todo o seguimento; presença de escape virológico: carga viral em algum momento acima de 400 cópias/ml);
 - perfil lipídico (alterado – pelo menos 2 resultados fora dos limites de normalidade; não alterado);
 - Índice HOMA-IR (normal – abaixo e igual a 2,5; alterado - acima de 2,5).
- Variável a ser controlada na análise:
- Quantificação do número de células CD4+.

Foram ajustados modelos de regressão lineares simples e múltiplos (considerando a contagem do número de células CD4+ como covariável). Também, foram comparadas médias dos níveis de sTNFR1, de sCD14, da porcentagem de HLADR⁺CD38⁺, da quantificação da produção de interferon alfa no ensaio de QuantiFERON-CMV entre os grupos de indivíduos que estavam acima ou abaixo do percentil 75, por meio do ajuste de modelos de regressão lineares simples e múltiplos (considerando CD4+ como covariável). Nas associações entre as

variáveis categóricas razão IgG CMV (<4 ou ≥ 4), resultado qualitativo de QuantiFERON CMV, carga viral HIV, perfil lipídico e Índice HOMA-IR e a variável que indica se o indivíduo estava acima ou abaixo do P75, foram estimados riscos relativos e seus intervalos de confiança 95%, por meio do ajuste de modelos de regressão log-binomial.

Não foi possível avaliar a associação da recorrência viral detectada por meio da técnica de *RT-PCR* com a evolução da cIMT devido à baixa identificação de recorrência.

Os softwares utilizados foram o SAS 9.4 e o R 3.4.2.

3. RESULTADOS

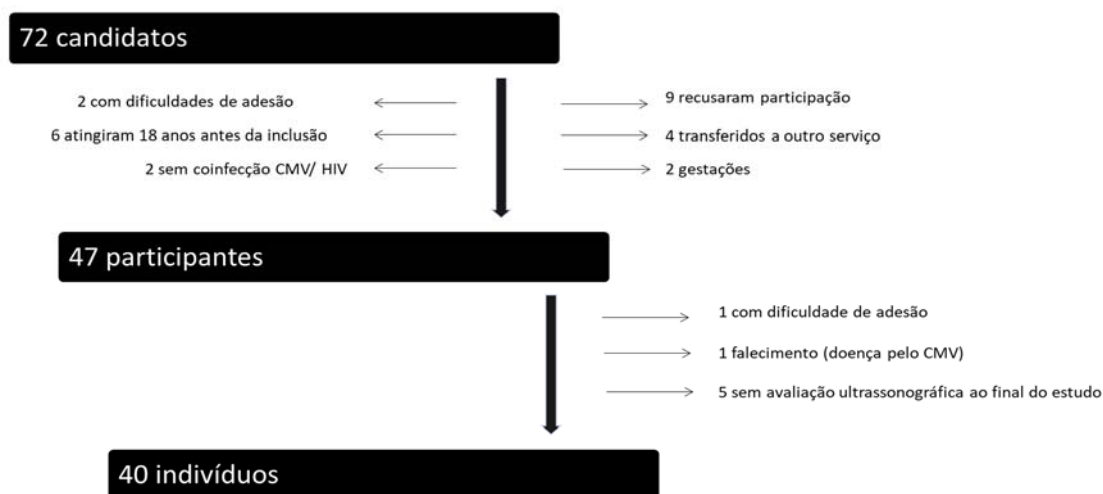
3.1. Participantes do Estudo

3.1.1. Composição dos participantes de estudo

Foram convidadas a participar todas as crianças e adolescentes elegíveis, sendo identificados, inicialmente, 72 possíveis candidatos. Devido à recusa na participação (9), transferência a outro serviço (4), gestação (2), dificuldades de adesão (2), ter atingido 18 anos até o início do estudo (6) e não apresentarem confirmação da coinfeção CMV/HIV (2) foram incluídos 47 indivíduos.

Entre os coinfectados CMV/ HIV um paciente foi excluído ao longo do estudo devido à dificuldade em aderir às avaliações previstas, um paciente faleceu após 6 meses de seguimento devido à doença pelo CMV e 5 não realizaram a avaliação ultrassonográfica principal ao final do período de seguimento. Portanto 40 indivíduos completaram todas as avaliações necessárias para a análise do objetivo principal do estudo. O fluxograma abaixo sintetiza o processo de definição do grupo de estudo.

Figura 5. Fluxograma da seleção dos participantes do estudo.



3.1.2. Características dos participantes do estudo

As características iniciais se encontram resumidas na Tabela 1 e as relacionadas à infecção pelo vírus HIV estão apresentadas na Tabela 2. Os participantes do estudo constituíram um grupo que em sua maioria adquiriram a infecção por transmissão vertical, com a média de idade de 14 anos na entrada no estudo. Houve maior número de indivíduos

do sexo feminino em relação ao masculino. Embora metade dos adolescentes apresentasse classificação clínica ou imunológica segundo o CDC indicando complicação clínica ou imunológica prévias graves, a maioria dos participantes se encontravam assintomáticos e em bom estado imunológico no início do estudo, segundo classificação da OMS, mantendo esta durante o seguimento. Todos os indivíduos estavam com prescrição de medicação antirretroviral e a maioria fazia uso com boa adesão e controle virológico, com carga viral do HIV abaixo de 400 cópias/ ml.

Tabela 1. Dados gerais do grupo avaliado no estudo.

| Forma de aquisição da infecção pelo vírus HIV | | |
|--|-----------------------|--------|
| Vertical | 38 | 95.00% |
| Abuso sexual | 2 | 5.00% |
| Idade | | |
| Média (min.; máx.) | 14,19 (10,30 – 17,80) | |
| Mediana | 14,60 | |
| Sexo | | |
| Feminino | 26 | 65.00% |
| Masculino | 14 | 35.00% |

Tabela 2. Características clínicas, virológicas e imunológicas relacionadas à infecção pelo vírus HIV à entrada do estudo dos 40 participantes.

| | N | % |
|--|----------------------------|---------------------------|
| Contagem de células CD4+/mm³ | | |
| <200 | 1 | 2.50 |
| 200-500 | 6 | 15.00 |
| >500 | 33 | 82.50 |
| Porcentagem de células CD4+ | | |
| <15% | 2 | 5.00 |
| 15-25% | 6 | 15.00 |
| >25% | 32 | 80.00 |
| Relação CD4+/ CD8+ | | |
| <1 | 27 | 67.50 |
| >1 | 13 | 32.50 |
| Quantificação da Carga Viral do HIV Inicial (cópias/ml) | | |
| <limite mínimo (40 cópias/ml) | 21 | 52.50 |
| 40 - 400 | 7 | 17.50 |
| 400 - 1.000 | 1 | 2.50 |
| 1.000 – 10.000 | 10 | 25.00 |
| 10.000 – 100.000 | 0 | 0.00 |
| Acima de 100.000 | 1 | 2.50 |
| | Média (min. – max.) | Mediana (P25– P75) |
| Nadir de células CD4+ | 435,50 (5,00 – 952,00) | 404,00 (300,50 – 578,50) |
| Nadir de % células CD4+ | 19,30 (0,80 – 33,10) | 19,03 (14,50 – 24,05) |
| Idade no nadir de células CD4+ | 7,38 (0,20 – 15,60) | 8,05 (4,30 - 10,45) |
| Classificação Clínica e Imunológica (CDC) | | |
| | N | % |
| N1 | 0 | 0.00 |
| N2 | 2 | 5.00 |
| N3 | 1 | 2.50 |
| A1 | 0 | 0.00 |
| A2 | 3 | 7.50 |
| A3 | 3 | 7.50 |
| B1 | 2 | 5.00 |
| B2 | 9 | 22.50 |
| B3 | 3 | 7.50 |
| C1 | 1 | 2.50 |
| C2 | 5 | 12.50 |
| C3 | 11 | 27.50 |
| Classificação Imunológica OMS(117) | | |
| Nenhuma ou não significativa | 36 | 90.00 |
| Leve | 2 | 5.00 |
| Avançada/grave | 2 | 5.00 |
| Classificação Clínica OMS (117) | | |
| Estágio clínico 1 | 39 | 97.50 |
| Estágio clínico 2 | 1 | 2.50 |
| Estágio clínico 3 | 0 | 0.00 |
| Estágio clínico 4 | 0 | 0.00 |

Com relação à terapia antirretroviral (TARV), os indivíduos apresentavam semelhança no tipo de medicação utilizado previamente à entrada no estudo. Todos já tinham

feito uso dos inibidores da transcriptase reversa análogos nucleosídeos/nucleotídeos (ITRN), somente seis indivíduos nunca haviam utilizado os inibidores da transcriptase reversa não análogos nucleosídeos (ITRNN) e oito não tinha experiência com os inibidores de protease (IP). Dois pacientes já haviam feito uso de inibidor de fusão (Enfuvirtida) e seis de inibidor de integrase (Raltegravir).

Entre os pacientes em uso de inibidores de protease, a maioria (23) estava em uso de Lopinavir/ Ritonavir, sete em uso de Darunavir/ Ritonavir e dois em uso de Atazanavir/ Ritonavir. Entre os que usavam ITRNN, oito usavam Nevirapina, três Efavirenz e dois Etravirina. Entre os que usavam ITRN somente dois indivíduos não faziam uso de Lamivudina e doze não faziam uso de Zidovudina. Dez indivíduos usavam Tenofovir, dois Abacavir e uma paciente fazia uso de Estavudina e Didanosina. Ao longo do seguimento, seis indivíduos tiveram troca de esquema antirretroviral devido à falha virológica. A Tabela 3 sumariza as informações relacionadas a terapia antirretroviral.

Tabela 3. Experiência de uso de antirretrovirais e medicações em uso durante o período de estudo.

| Terapia Antiretroviral em uso | | N | % |
|--|-------------------------------------|--------------|----------|
| ITRN | | 40 | 100.00 |
| ITRNN | | 13 | 32.50 |
| IP | | 30 | 75.00 |
| Inibidor da Integrase | | 6 | 15.00 |
| Uso prévio à entrada no estudo | | | |
| ITRN | | 40 | 100.00 |
| ITRNN | | 34 | 85.00 |
| IP | | 31 | 77.50 |
| Inibidor de Fusão | | 2 | 5.00 |
| Inibidor de Integrase | | 6 | 15.00 |
| Trocas de TARV durante o seguimento | | | |
| TARV anterior | Novo esquema | N | |
| ITRN + ITRNN | ITRN + IP | 4 indivíduos | |
| ITRN + IP | ITRN + IP + Raltegravir | 1 indivíduo | |
| ITRN + IP | ITRN + IP + Raltegravir + Maraviroc | 1 indivíduo | |

ITRN- inibidores da transcriptase reversa análogos nucleosídeos/nucleotídeos;

ITRNN- inibidores da transcriptase reversa não análogos nucleosídeos

IP- inibidores de protease

Havia três indivíduos que já tinham apresentado diagnóstico de infecção pelo Citomegalovírus sintomática e estes receberam tratamento com antiviral específico (Ganciclovir). Um indivíduo apresentou infecção congênita documentada, porém sem identificação de sintomas associados e não necessitou de tratamento. Todos os que receberam tratamento também mantiveram uso de Ganciclovir profilático até controle virológico da infecção pelo HIV e recuperação imune. A Tabela 4 mostra detalhes das características da infecção pelo CMV nesses indivíduos.

Tabela 4. Histórico de doença pelo Citomegalovírus e tratamento antes da entrada no estudo.

| Doença prévia pelo CMV | N | % |
|------------------------------------|----------|----------|
| Sim | 5 | 12.50 |
| Não | 35 | 87.50 |
| Tipo de doença | N | % |
| Colite | 0 | 0.00 |
| Sistema linfohematopoiético | 1 | 2.50 |
| Congênito sintomático confirmado | 1 | 2.50 |
| Congênito assintomático confirmado | 1 | 2.50 |
| Congênito suspeito sintomático | 1 | 2.50 |
| Total | 40 | 100.00 |
| Tratamento/ Profilaxia | | |
| Uso de Ganciclovir terapêutico | 3 | 7.50 |
| Uso de Ganciclovir profilático | 3 | 7.50 |

3.2. Evolução do tratamento da infecção pelo vírus HIV ao longo do estudo

O tratamento da infecção pelo vírus HIV se manteve estável nos participantes durante o período de seguimento no estudo, como pode ser verificado na evolução dos valores da contagem de células CD4+ e da quantificação da carga viral, descritos na Tabela 5. A descrição detalhada dos valores de células CD4+, com os valores médios e limites encontrados ao longo do primeiro e do segundo ano de seguimento estão mostrados na Tabela 6.

As mensurações de células CD4+ e quantificação viral realizadas a cada 3 meses foram apresentados a partir da média dos resultados encontrados no primeiro ano de seguimento (0 – 12 meses) e no segundo ano de seguimento (12 – 24 meses), para cada indivíduo. A maioria apresentava número de células CD4+ acima do limite superior ideal (500), uma condição que indica bom controle imunológico, com os valores percentuais também adequados (>25%). A razão do número de células CD4+ em relação ao número de células CD8+, no entanto, se encontrava abaixo de 1 para a maioria das crianças e adolescentes, indicando que, provavelmente, para estes o sistema imunológico apresentava alterações e comprometimento decorrentes da infecção pelo vírus HIV e seu tratamento prévio.

Com relação ao controle virológico, a maior parte do grupo apresentou controle da viremia definido pela quantificação da carga viral do HIV abaixo de 400 cópias/ ml, apresentando a maioria valores abaixo do limite de detecção do ensaio (<40 cópias/ ml). Dezesete participantes mantiveram carga viral abaixo de 400 cópias/ml durante todo o período de seguimento. No primeiro ano, 20 dos participantes apresentaram pelo menos um valor acima deste limite e no segundo ano 15 apresentaram pelo menos um resultado acima deste valor.

Tabela 5. Contagem de células CD4 e da quantificação da carga viral do HIV ao longo do estudo.

| Contagem de células CD4+/mm³ | <200 | 200-500 | >500 | Total | | | |
|--|----------------|--------------------------|--------------------|-----------------------|-------------------------|--------------------|--------------|
| Entrada | 1 (2.50%) | 6 (15.00%) | 33 (82.50%) | 40 | | | |
| 0 – 12 meses | 0 (0.00%) | 7 (17.50%) | 33 (82.50%) | 40 | | | |
| 12 – 24 meses | 0 (0.00%) | 6 (15.00%) | 34 (85.00%) | 40 | | | |
| Porcentagem de células CD4+ | <15% | 15-25% | >25% | | | | |
| Entrada | 2 (5.00%) | 6 (15.00%) | 32 (80.00%) | 40 | | | |
| 0 – 12 meses | 2 (5.00%) | 7 (17.50%) | 31 (77.50%) | 40 | | | |
| 12 – 24 meses | 1 (2.50%) | 5 (12.50%) | 34 (85.00%) | 40 | | | |
| Relação CD4+/ CD8+ | <1 | > ou igual a 1 | Total | | | | |
| Entrada | 27 (67.50%) | 13 (32.50%) | 40 | | | | |
| 0 – 12 meses | 25 (62.50%) | 15 (37.50%) | 40 | | | | |
| 12 – 24 meses | 26 (65.00%) | 14 (35.00%) | 40 | | | | |
| Carga Viral do HIV (cópias/ml) | <40 | 40 - 400 | 400 - 1.000 | 1.000 – 10.000 | 10.000 – 100.000 | >100.000 | Total |
| Entrada | 21(52.50%) | 7 (17.50%) | 1 (2.50%) | 10(25.00%) | 0 (0.00%) | 1 (2.50%) | 40 |
| 0 - 12 m | 16(40.00%) | 7 (17.50%) | 3 (7.50%) | 11(27.50%) | 1 (2.50%) | 2 (2.00%) | 40 |
| 12 - 24m | 19(47.50%) | 9 (22.50%) | 2 (5.00%) | 7 (17.50%) | 3 (7.50%) | 0 (0.00%) | 40 |

Tabela 6. Evolução dos valores de contagem de células CD4 nas visitas do estudo.

| Contagem de células CD4+ | Media (DP) | Min. – Max. | Mediana | P25 – P75 |
|---------------------------------|-------------------|--------------------|----------------|------------------|
| Entrada | 756,95 (296,08) | 143,00 –1433,00 | 756,00 | 581,50 – 956,50 |
| 0 – 12 meses | 813,58 (300,88) | 258,50 –1251,00 | 799,63 | 597,38 –1063,50 |
| 12 - 24 meses | 830,26 (304,26) | 232,35 –1400,33 | 826,25 | 622,50 – 1400,33 |

3.3. Evolução das características clínicas dos indivíduos durante o período do estudo

A avaliação clínica e antropométrica realizada a cada 6 meses permitiu caracterizar os participantes com relação ao desenvolvimento da puberdade ao longo do estudo e aos fatores de risco que podem se associar ao desenvolvimento de aterosclerose. Com relação ao uso de tabaco, utilizado como critério para não inclusão no estudo, nenhum indivíduo fez uso ao longo do período de seguimento, tendo sido questionado nas avaliações clínicas do estudo. O uso de bebidas alcoólicas foi relatado por somente 7 indivíduos ao longo do estudo e o uso foi eventual.

A história familiar no início do seguimento foi questionada e a presença de risco foi relacionada somente a parentes de segundo grau. A Tabela 7 resume as principais características clínicas.

3.3.1. Estadiamento puberal

Do total de participantes, metade já se encontrava na classificação final do estadiamento de Tanner (12 do sexo feminino e 8 do sexo masculino) na entrada, portanto com as mudanças corporais já em estágio final. Ao final do estudo a maioria dos participantes se encontrava neste estágio (24 do sexo feminino e 10 do sexo masculino). Metade passou por períodos de transformação corporal característicos da puberdade ao longo do estudo. Três indivíduos eram impúberes na entrada e iniciaram o desenvolvimento puberal durante o período de seguimento.

3.3.2. Índice de Massa Corporal (IMC)

Os participantes do estudo não apresentaram obesidade em nenhuma das medidas de IMC calculadas de acordo com o peso e a estatura medidos nas avaliações. Quatro pacientes na entrada e 3 ao longo das demais avaliações apresentaram sobrepeso. A maioria dos participantes apresentavam IMC entre os percentis 10 e 85 de acordo com a referência utilizada. Oito indivíduos na entrada, 7 no primeiro ano e 5 no segundo ano apresentavam IMC abaixo do percentil 10.

3.3.3. Pressão arterial

Para definição de pressão arterial elevada o indivíduo deveria apresentar medidas de pressão arterial persistentemente acima do percentil 90 da referência para o sexo e a estatura.

Durante o seguimento nenhum indivíduo apresentou esta alteração, embora 9 tenham apresentado medidas isoladas de PA acima deste limite, mas abaixo do percentil 95 da referência.

3.3.4. Circunferência abdominal

A circunferência abdominal elevada foi definida como acima do percentil 90 da referência de acordo com sexo e idade. Somente 2 indivíduos apresentaram nas visitas de 6 meses e 12 meses a circunferência abdominal acima dos limites de normalidade, passando para valores dentro dos limites nas visitas subsequentes.

3.3.5. Glicemia de jejum, insulinemia, Índice HOMA e Hemoglobina glicosilada

Durante o seguimento, todos os pacientes apresentaram níveis de glicemia de jejum dentro da normalidade, nenhum teve o diagnóstico de diabetes. Com o intuito de caracterizar aqueles indivíduos que possivelmente já possam apresentar resistência insulínica ao final do estudo foram calculados o índice HOMA-IR e a dosagem de hemoglobina glicosilada. Nesta avaliação foram identificados 18 participantes com alteração, sendo 18 com índice HOMA-IR acima do valor de referência para normalidade e 1 destes também com hemoglobina glicosilada com valor indicando alto risco de diabetes (valor entre 5,7 e 6,4%). Os valores de HOMA IR entre os que apresentaram alteração se encontravam entre 2,5 a 3,0 para 6 indivíduos e maior que 3,0 para 12 indivíduos.

3.3.6. Perfil lipídico

A alteração de perfil lipídico mais frequentemente detectada foi o baixo nível de HDL-colesterol (HDL-C), seguida da elevação de triglicerídeos e por último as alterações de colesterol total e LDL-colesterol (LDL-C). Somente 3 indivíduos não apresentaram nenhuma alteração de perfil lipídico durante o seguimento no estudo, portanto houve a prevalência de 92,5% de alteração no grupo estudado. Para definição de dislipidemia foi considerada a presença de alteração em pelo menos 2 dos 4 parâmetros (colesterol total, triglicerídeos, LDL-C, HDL-C), com a finalidade de avaliar sua associação com a evolução da medida da intima e média das artérias carótidas. O detalhamento das alterações encontradas de acordo com cada parâmetro e divididas pelo período de seguimento se encontram na Tabela 6 e no anexo 3.

Tabela 7. Evolução das características clínicas e laboratoriais dos participantes do estudo.

| Estadiamento puberal | Impúbere (G1P1/ M1P1) | Em desenvolvimento (estágios 2,3 e 4) | Maturação completa (G5P5/ M5P5) |
|---------------------------------|----------------------------------|--|--|
| Entrada | 3 (7.50%) | 17 (42.50%) | 20 (50.00%) |
| 0 - 12 meses | 0 (0.00%) | 11 (27.50%) | 29 (72.50%) |
| 12 - 24 meses | 0 (0.00%) | 6 (15.00%) | 34 (85.00%) |
| Índice de Massa corporal | Abaixo do percentil 85 | Percentil 85 até 95 | Total |
| Entrada | 36 (90.00%) | 4 (10.00%) | 40 |
| Demais avaliações | 37 (92.50%) | 3 (7.50%) | 40 |
| Circunferência abdominal | Abaixo do percentil 90 | Acima do percentil 90 | |
| Entrada | 40 (100.00%) | 0 (0.00%) | |
| 0 – 12 meses | 38 (95.00%) | 2 (5.00%) | |
| 12 – 24 meses | 40 (100.00%) | 0 (0.00%) | |
| Resistência insulínica | Alterado | Não alterado | Total |
| Índice HOMA IR | 18 (45.00%) | 22 (55.00%) | 40 |
| Hemoglobina glicosilada | 1 (2.50%) | 39 (97.50%) | 40 |
| Dislipidemia | Alterado | Não alterado | Total |
| 0 - 12 meses | 29 (72.50%) | 11 (27.50%) | 40 |
| 12 - 24 meses | 24 (60.00%) | 16 (40.00%) | 40 |

3.4. Recorrência da infecção pelo CMV

Para a análise da recorrência viral da infecção pelo CMV foram considerados os 47 indivíduos que realizaram as avaliações propostas. Os 7 indivíduos adicionais incluídos nesta análise consistiam de 2 com imunossupressão grave e permanente ao longo do seguimento (CD4+ abaixo de 200 células/mm³ porcentagem de CD4+ abaixo de 15%). Os 5 demais indivíduos apresentavam número de células CD4+ acima de 500 e porcentagem de CD4+ acima de 15%.

A incidência de recorrência foi calculada considerando o denominador composto indivíduo/mês, tendo em vista que há participantes que não realizaram todas as avaliações previstas. Foram avaliadas 411 amostras ao todo, sendo 9 amostras por indivíduo, exceto para 2 participantes que seguiram no estudo somente por 6 meses.

A incidência encontrada no estudo foi de **0,97/ 100 indivíduos-mês**. Somente 4 avaliações tiveram resultado positivo, sendo que somente 3 indivíduos apresentaram recorrência. Todos identificados pela técnica de *RT-PCR*.

Duas dessas recorrências ocorreram na visita de 15 meses, uma na visita de 18 meses e uma na visita de 6 meses, sendo esta última em um indivíduo que evoluiu com doença pelo Citomegalovírus seguida por óbito. Foram 2 os demais participantes, tendo 1 deles a detecção viral em 2 ocasiões. Estes não apresentaram nenhum sinal ou sintoma clínico e não foram submetidos a nenhuma avaliação clínica ou laboratorial adicional. O *RT-PCR* para CMV foi repetido após os resultados positivos iniciais. No indivíduo que evoluiu com doença foi realizado o tratamento antiviral e a quantificação viral foi repetida semanalmente até 2 semanas após o resultado inicial, sem ocorrer negatificação. Para os demais indivíduos as repetições foram realizadas assim que o resultado final do exame se encontrava disponível, tendo sido feitos com intervalos de 12 dias, 24 dias e 35 dias. Todos estes resultados das repetições foram negativos para a identificação do DNA viral. Características desses indivíduos são apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8. A tabela abaixo descreve as características clínicas dos 3 indivíduos que apresentaram detecção do Citomegalovírus.

| CARACTERÍSTICAS | INDIVÍDUO 1 | INDIVÍDUO 2 | INDIVÍDUO |
|--|--|--|--|
| Forma de aquisição da infecção pelo vírus HIV: | Vertical | Vertical | Vertical |
| Idade na entrada: | 15 anos | 14 anos | 14 anos |
| Sexo: | Feminino | Feminino | Masculino |
| Classificação OMS na visita inicial (Clínica/Imunológica): | Assintomático/ None | Assintomático/ None | Estágio Clínico 1/ Severe |
| Classificação CDC: | A3 | C2 | C3 |
| Doença pelo CMV prévia: | Não | Não | Sim (colite há 6 anos) |
| Terapia Antiretroviral em uso: | Zidovudina + Lamivudina + Lopinavir/ Ritonavir | Zidovudina + Lamivudina + Lopinavir/ Ritonavir | Zidovudina + Lamivudina + Lopinavir/ Ritonavir |
| Média da contagem de células CD4+ (min. – max.): | 570,74 (426,0 – 738,0) | 1.132,67 (897,0 – 1.451,0) | 55,00 (50,0 – 60,0) |
| Porcentagem de células CD4+ (min. – max.): | 29,78 (25,0 – 33,0) | 41,62 (34,0 – 47,6) | 3,5 (3,0 – 4,0) |
| Relação de células CD4+/ CD8+ (min. – max.): | 0,71 (0,50 – 0,82) | 1,41 (0,72 – 2,0) | 0,05 (0,04 – 0,06) |
| Log da Quantificação da Carga Viral do HIV (min. – max.): | 2,20 (<40 – 3,27) | 2,10 (<40 – 4,28) | 4,72 (4,72 – 4,72) |
| Log PCR CMV (visita): | 3,68 (15 meses) 3,58 (18 meses) | 3,17 (15 meses) | 4.45 (6 meses) |
| Quantiferon CMV: | Reativo | Reativo | Não realizado |
| Média de interferon Quantiferon CMV (UI/ml): | 1,25 | 4,50 | -- |
| Sorologia para CMV IgG (18 e 24m): | 125 e 151 UI/ml | 56,20 e 54,80 UI/ml | -- |

Todos os resultados obtidos pela técnica de Antigenemia foram negativos. Quando foi utilizado este exame os indivíduos testados apresentavam contagem de neutrófilos acima

1000 no momento das avaliações, exceto por um participante que apresentou contagem de 500 células em uma das avaliações.

Tendo em vista a baixa frequência de identificação de recorrência viral pela técnica de *RT-PCR* no grupo de indivíduos estudado não foi possível avaliar a associação deste fator com o aumento da espessura da íntima e da média da artéria carótida.

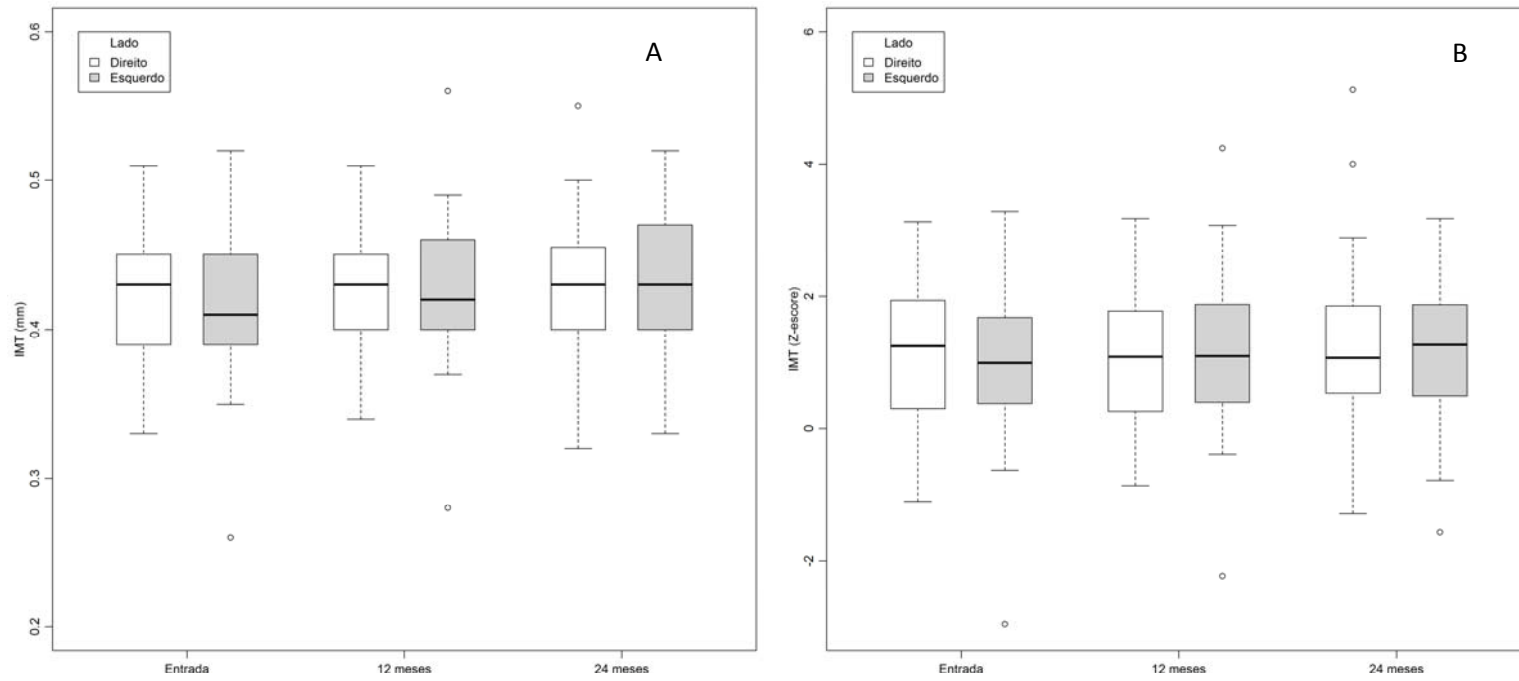
3.5. Evolução da espessura da íntima e média das artérias carótidas ao longo de 2 anos.

Trinta e cinco indivíduos realizaram avaliação ultrassonográfica ao final de 12 meses de seguimento no estudo. No entanto, todos os 40 participantes foram avaliados com 24 meses de idade. A Tabela 9 e a Figura 6 apresentam os resultados em valores absolutos e escores z dessas medidas.

Tabela 9. Valores absolutos em milímetros (mm) e *escores z* das medidas de espessura da íntima e média das artérias carótidas comuns direita e esquerda segundo o momento de avaliação.

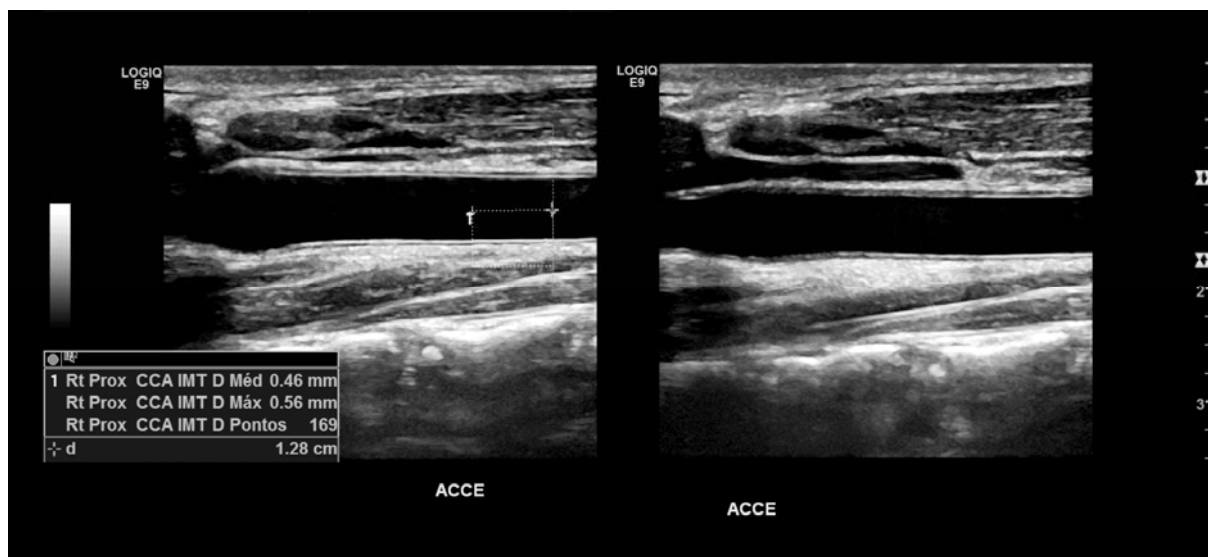
| Momento de avaliação | Carótida comum | Medida | Média (1 DP) | Mínimo / máximo | Mediana (P25 –P75) |
|----------------------|----------------|----------|--------------|-----------------|--------------------|
| Entrada (n=40) | Direita | mm | 0.42 (0.04) | 0.33/ 0.51 | 0.43 (0.39 – 0.45) |
| | | escore z | 1.08 (1.08) | -1.10/ 3.12 | 1.26 (0.31 – 1.94) |
| | Esquerda | mm | 0.42 (0.05) | 0.26/ 0.52 | 0.41 (0.39 – 0.45) |
| | | escore z | 0.96 (1.17) | -2.96/ 3.28 | 1.00 (0.39 – 1.69) |
| 12 meses (n=35) | Direita | mm | 0.42 (0.04) | 0.34/ 0.51 | 0.43 (0.40 – 0.45) |
| | | escore z | 1.13 (1.04) | -0.86/ 3.17 | 1.09 (0.18 – 1.83) |
| | Esquerda | mm | 0.43 (0.05) | 0.28/ 0.56 | 0.42 (0.40 – 0.46) |
| | | escore z | 1.15 (1.24) | -2.23/ 4.24 | 1.10 (0.25 – 1.92) |
| 24 meses (n=40) | Direita | mm | 0.43 (0.05) | 0.32/ 0.55 | 0.43 (0.40 – 0.46) |
| | | escore z | 1.16 (1.27) | -1.29/ 5.12 | 1.08 (0.54 – 1.86) |
| | Esquerda | mm | 0.43 (0.05) | 0.33/ 0.52 | 0.43 (0.40 – 0.47) |
| | | escore z | 1.18 (1.04) | -1.57/ 3.17 | 1.28 (0.50 – 1.88) |

Figura 6. Boxplots da distribuição dos valores absolutos em milímetros (A) e de escores z (B) das medidas de espessura de íntima e média (IMT) das artérias coronárias comuns direita e esquerda segundo o momento de avaliação.



A figura 7 abaixo é uma imagem ultrassonográfica da medida de cIMT, obtida no estudo segundo o protocolo estabelecido na pesquisa.

Figura 7. Imagem ultrassonográfica da medida de cIMT.



Como mostra a Tabela 10, na comparação dos valores de cIMT obtidos na avaliação inicial e na última avaliação realizada no estudo não foi encontrada diferença entre estes, tanto quando se considerou cada um dos lados direito e esquerdo isoladamente e utilizando a média entre estes. O mesmo resultado foi obtido na avaliação dos escores-z.

Tabela 10. Medidas de cIMT na avaliação inicial e aos 24 meses segundo modelo simples e múltiplo de análise de dados.

| Variável | 24m-Ent | Modelo simples | | 24m-Ent | Modelo múltiplo | |
|------------------------|---------|----------------|----------------|---------|-----------------|----------------|
| | | p-valor | IC95% | | p-valor | IC95% |
| Carótida Dir | 0,007 | 0,47 | (-0,01; 0,02) | 0,003 | 0,78 | (-0,02; 0,03) |
| Carótida Esq | 0,01 | 0,11 | (-0,003; 0,03) | 0,01 | 0,17 | (-0,006; 0,03) |
| Média Dir/Esq | 0,008 | 0,22 | (-0,005; 0,02) | 0,007 | 0,40 | (-0,01; 0,02) |
| Escore z Carotida Dir | 0,08 | 0,75 | (-0,44; 0,59) | 0,06 | 0,84 | (-0,53; 0,64) |
| Escore z Carótida Esq | 0,21 | 0,25 | (-0,16; 0,59) | 0,31 | 0,17 | (-0,14; 0,76) |
| Média escore z Dir/Esq | 0,12 | 0,47 | (-0,22; 0,46) | 0,17 | 0,40 | (-0,23; 0,56) |

Carótida Dir: artéria carótida comum direita; Carótida Esq: artéria carótida comum esquerda; Média Dir/Esq: média das medidas de carótidas direita e esquerda. IC95%: intervalo de confiança 95%; 24m-Ent: diferença entre as medidas com 24m e da entrada no estudo.

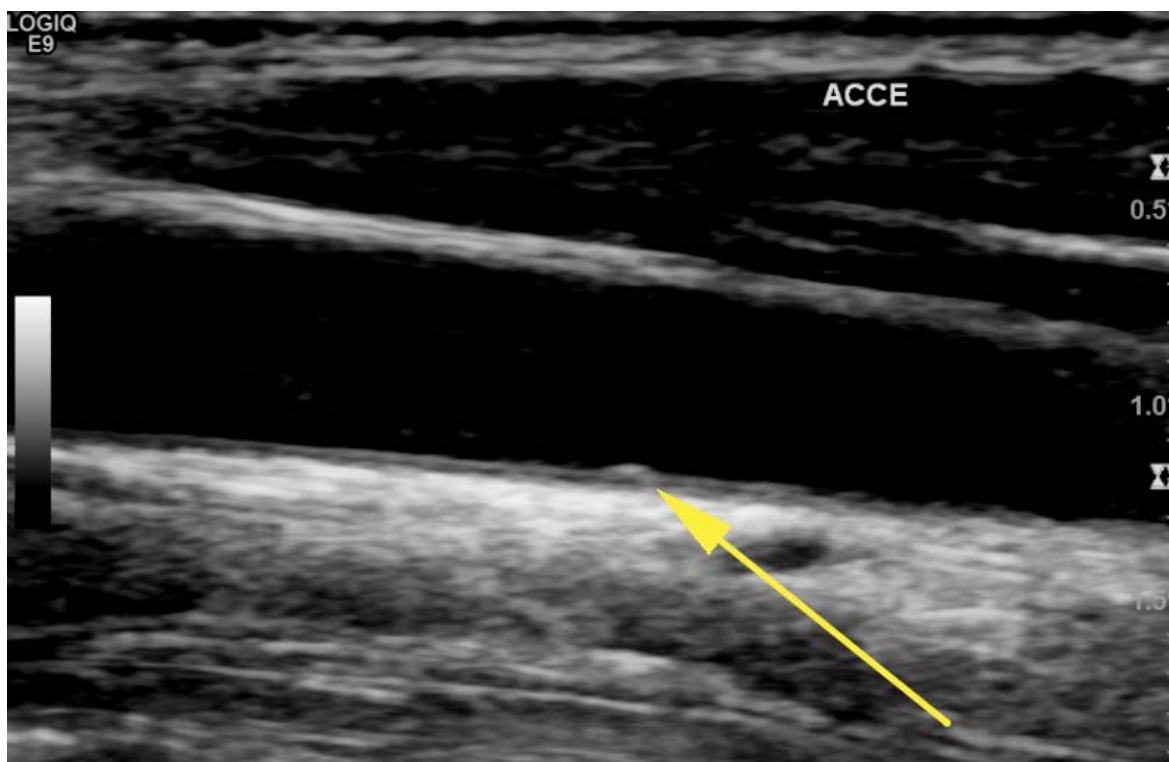
Na Tabela mostrada a seguir (Tabela 11), observa-se que já na entrada, os valores médios de espessura das camadas íntima e média das artérias carótidas internas de 28/40 (70%) crianças situavam-se acima do Percentil 75 dos valores de referência para idade, estatura e sexo. Incremento de percentil foi observado em 7 crianças, ao longo de 2 anos. Houve a identificação de uma área de espessamento localizado na artéria carótida comum de um dos indivíduos na última visita do estudo, que corresponde a uma lesão de placa, como pontuado na tabela abaixo. A imagem ultrassonográfica desta lesão se encontra na figura 8.

Tabela 11. Caracterização da evolução do grupo estudado segundo a presença de Média CIMT acima do percentil 75 do valor de referência¹ segundo o sexo e estatura.

| Evolução da CIMT | |
|---|------------|
| Acima do P75 em todo o período de seguimento | 20 (50.00) |
| Acima do P75 na entrada e abaixo ao final | 8 (20.00) |
| Abaixo do P75 na entrada e acima ao final | 7 (17.50) |
| Abaixo do P75 em todo o período de seguimento* | 5 (12.50) |
| Total | 40 |
| Presença de placa aterosclerótica* | 1 (2.50) |

*O indivíduo que apresentou a placa aterosclerótica no exame de 24 meses apresentou evolução de IMT abaixo do P75 durante o período de seguimento.1- Doyon et al⁽³⁴⁾.

Figura 8. Espessamento focal mediointimal na carótida comum esquerda de um dos participantes, compatível com lesão aterosclerótica.



3.6. Imunidade específica ao Citomegalovírus e marcadores de ativação imunológica

3.6.1. Marcadores específicos da infecção pelo Citomegalovírus

3.6.1.1. Sorologia para CMV

Todos os 40 indivíduos eram soropositivos para CMV à entrada do estudo. Nenhum indivíduo apresentou valores de IgM acima do cut-off do teste (22,00 UI/ml) durante o seguimento.

A Tabela 12 mostra a distribuição de dados relativos à quantificação de anticorpos séricos IgG anti-CMV de acordo com o momento de avaliação.

Tabela 12. Distribuição dos níveis de IgG séricos anti-CMV (UI/ml) obtidos em 40 participantes segundo o momento de avaliação.

| Momento de avaliação | Média (DP) | Mín. / máx. | Mediana (P25 –P75) |
|----------------------|-----------------|---------------|-------------------------|
| Entrada | 177,82 (212,47) | 14,09/921,00 | 107,50 (77,95 – 152,50) |
| 6 meses | 198,50 (239,10) | 14,00/ 961,00 | 108,00 (81,10 – 156,50) |
| 12 meses | 219,19 (316,02) | 14,00/ 151,00 | 114,50 (74,70 – 151,00) |
| 18 meses | 102,69 (37,42) | 15,00/ 180,00 | 98,00 (78,00 – 128,00) |
| 24 meses | 104,36 (40,64) | 14,50/ 180,00 | 104,00 (75,20 – 139,00) |

Observou-se que nove (22,5%) sujeitos apresentaram incremento de quatro vezes quando se compararam títulos obtidos em momentos diferentes ao longo do período de seguimento do estudo, enquanto que para os demais esses títulos permaneceram estáveis. Estes participantes não tiveram viremia pelo CMV identificada no estudo, no entanto os altos títulos de anticorpos IgG podem refletir a estimulação antigênica em um período que não foi possível detectar nas avaliações previstas no seguimento. Os resultados relativos aos valores de IgG obtidos segundo os participantes e os momentos, estão apresentados no anexo 3.

3.6.1.2. Ativação da imunidade de células TCD8+ específica para o CMV com a produção de IFN-gama após estímulo antigênico (QuantIFERON-CMV^R):

Na avaliação da imunidade específica pelo CMV, com a verificação da ativação das células TCD8+, por meio da técnica de QuantIFERON CMV^R obtiveram-se os resultados descritos na tabela 13. As avaliações foram realizadas a cada 6 meses, porém não foi possível obter resultados de todos os momentos para todos os participantes, devido a problemas de coleta de material ou da técnica de análise do exame. Foram obtidas todas as 5 avaliações previstas de 20 indivíduos, 11 realizaram 4 avaliações, 7 tiveram 3 avaliações, 2 tiveram 2 avaliações e 1 indivíduo somente 1 testagem foi possível.

Trinta e um indivíduos apresentaram somente resultados REATIVOS em todas as suas avaliações e 4 apresentaram somente resultados NÃO REATIVOS. Três indivíduos tiveram 3 resultados REATIVOS e 1 NÃO REATIVO e um indivíduo apresentou 3 NÃO REATIVOS e um REATIVO. Estes foram classificados na análise final de acordo com o resultado que prevaleceu,

ficando os 3 primeiros considerados REATIVOS e o último NÃO REATIVO. Um indivíduo teve somente 2 resultados sendo 1 REATIVO e um NÃO REATIVO. Não houve resultados INDETERMINADOS nas avaliações realizadas. A Tabela 13 mostra esses dados.

Tabela 13. Resultados qualitativos e quantitativos de ativação de células TCD8+ específicas para o Citomegalovírus pela técnica de QuantiFERON-CMV.

| Momento da avaliação | Número de indivíduos testados | Reativo / Não reativo | Mediana (P25 –P75) dos reativos* (Interferon-γ UI/ml) |
|-----------------------------|--------------------------------------|------------------------------|--|
| Entrada | 30 | 23/ 7 | 4,54 (1,22 – 22,83) |
| 6 meses | 33 | 28/ 4 | 4,69 (1,26 – 26,25) |
| 12 meses | 33 | 27/ 6 | 4,70 (1,34 – 26,30) |
| 18 meses | 37 | 33/ 4 | 4,75 (1,32 – 25,45) |
| 24 meses | 36 | 33/ 3 | 4,82 (1,34 – 27,25) |

*Os resultados >100UI/ml foram considerados igual a 100UI/ml para cálculo da mediana

3.6.2. Marcadores inespecíficos de ativação imunológica

3.6.2.1. Receptor I de TNF alfa solúvel (sTNFR1)

A dosagem dos níveis de receptor I de TNF alfa solúvel estão representados para cada avaliação realizada a intervalos de 6 meses na Tabela 14. As crianças e adolescentes estudados apresentaram valores até 4ng/ml, que se encontram dentro dos valores estimados de normalidade⁽¹¹⁸⁾. Somente na entrada do estudo houve 4 indivíduos com valores acima deste limite.

Tabela 14. Distribuição dos valores de sTNFR (ng/ml) segundo o momento de avaliação e de indivíduos segundo a categorização dos valores de acordo com os níveis de referência do teste.

| Momento da avaliação | Média ng/ml (DP) | Mín. / máx. | Mediana (P25 –P75) |
|----------------------|------------------|-------------|--------------------|
| Entrada | 1,57 (1,33) | 0,10/ 6,44 | 1,23 (0,79 – 2,33) |
| 6 meses | 1,39 (0,74) | 0,44/ 3,90 | 1,27 (0,91 – 1,55) |
| 12 meses | 1,23 (0,57) | 0,48/ 3,13 | 1,08 (0,83 – 1,48) |
| 18 meses | 1,07 (0,23) | 0,64/ 1,88 | 1,02 (0,92 – 1,16) |
| 24 meses | 1,09 (0,28) | 0,74/ 1,84 | 1,00 (0,95 – 1,22) |

3.6.2.2. Molécula de CD14 solúvel (sCD14)

A dosagem dos níveis de sCD14 mostrou que a maioria dos sujeitos, ao longo de todo o período do estudo, apresentaram níveis elevados desta glicoproteína no plasma, como apresentado na Tabela 15.

Níveis acima de 3000 ng/ml são encontrados em quadros de sepse e são considerados muito elevados⁽¹¹⁹⁾. Os valores aqui encontrados estão acima dos descritos para adultos HIV (+) com bom controle da infecção⁽¹²⁰⁾. Isto pode refletir uma maior intensidade de ativação de células da linhagem monocitária (macrófagos e monócitos), representativa da ocorrência de translocação bacteriana ou de componentes celulares bacterianos a partir da parede intestinal.

Tabela 15. Distribuição dos valores de sCD14 (ng/ml) segundo o momento de avaliação e de indivíduos segundo a categorização dos valores de acordo com os níveis de referência do teste

| Momento da avaliação | Média ng/ml (DP) | Mín. / máx. | Mediana (P25 –P75) | | |
|------------------------------|-------------------------|--------------------|-----------------------------|------------|------------|
| Entrada | 3908,89 (847,00) | 2270,51/ 6439,60 | 3967,41 (3374,70 – 4451,00) | | |
| 6 meses | 3960,66 (1015,07) | 2190,46/ 6537,93 | 3937,06 (3294,66 – 4658,20) | | |
| 12 meses | 3783,03 (852,00) | 2318,10/ 6785,36 | 3713,69 (3328,14 – 4048,11) | | |
| 18 meses | 3636,80 (952,14) | 2135,79/ 6039,68 | 3411,94 (2990,75 – 3987,15) | | |
| 24 meses | 3490,71 (727,77) | 2594,97/ 5486,26 | 3304,97 (2917,21 – 3947,06) | | |
| Concentração de sCD14 | Entrada | 6m | 12m | 18m | 24m |
| 1500-3000 ng/ml | 5 (12.50) | 8 (20.00) | 6 (15.00) | 10 (27.02) | 12 (31.60) |
| >3000 ng/ml | 35 (87.50) | 32 (80.00) | 34 (85.00) | 27 (72.98) | 26 (68.40) |
| Total | 40 | 40 | 40 | 37 | 38 |

3.6.2.3. Marcador CD3+CD8+HLADR⁺CD38⁺

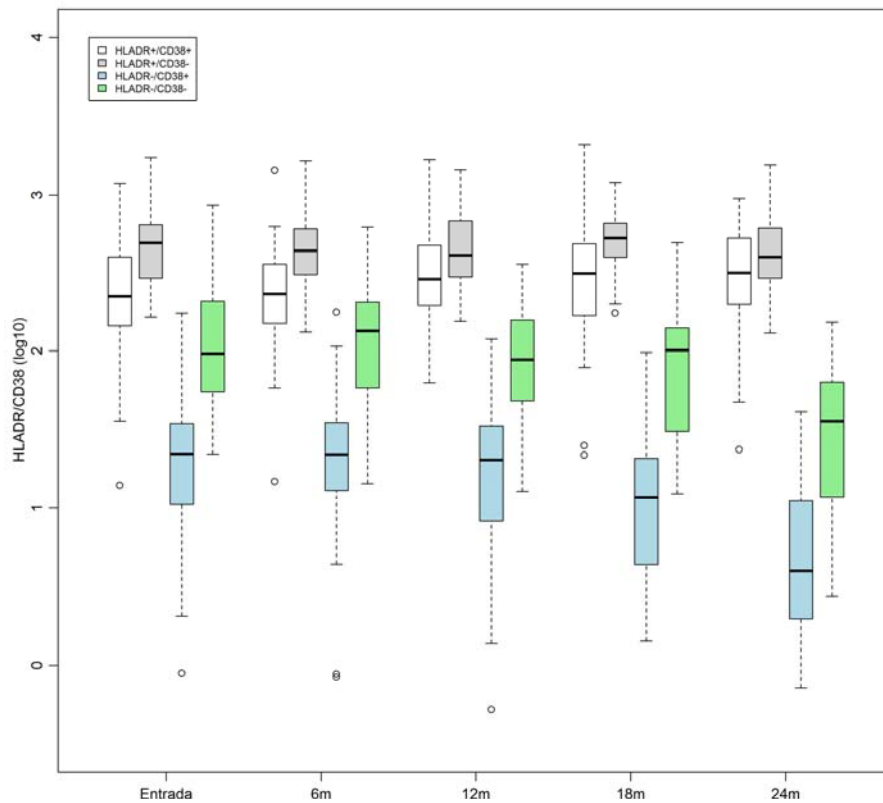
A porcentagem de células TCD8⁺ com a presença dos marcadores HLADR⁺ e CD38⁺ refletem a presença de células TCD8⁺ ativadas. Os valores encontrados no grupo de crianças e adolescentes estão sumarizados na Tabela 16 em porcentagem em relação ao total de linfócitos TCD8⁺.

Na Figura 9, os valores absolutos (\log_{10}) de células ativadas estão apresentados com relação à expressão dos marcadores HLA-DR e CD38. Houve predomínio na análise de citometria de células expressando HLADR⁺CD38⁻ quando comparado às células HLADR⁺CD38⁺, HLADR⁻CD38⁺, HLADR⁻CD38⁻.

Tabela 16. Distribuição de valores percentuais de células TCD3CD8+HLADR+CD38+ segundo o momento de avaliação.

| Momento da avaliação | Média (DP) | Mín. / máx. | Mediana (P25 –P75) |
|----------------------|--------------|-------------|----------------------|
| Entrada | 15,13 (8,85) | 4,59/ 43,86 | 12,37 (7,63 – 21,64) |
| 6 meses | 15,24 (8,35) | 2,40/ 40,15 | 14,80 (8,21 – 20,38) |
| 12 meses | 11,37 (7,09) | 0,68/ 27,52 | 10,67 (5,89 – 17,20) |
| 18 meses | 10,77 (8,71) | 1,63/ 40,42 | 7,68 (4,90 – 13,49) |
| 24 meses | 5,62 (4,97) | 0,55/ 17,19 | 3,40 (1,51 – 8,78) |

Figura 9. Distribuição de valores percentuais de células TCD3CD8HLADR+CD38+ segundo o momento de avaliação.



3.7. Influencia da imunidade específica ao CMV e de marcadores de ativação imunológica sobre a evolução da espessura das camadas íntima e média da artéria carótidas (cIMT)

Para a avaliação da associação entre os marcadores de ativação imunológica específicos para o CMV e marcadores inespecíficos de ativação imunológica foram utilizadas as médias de todos os valores obtidos durante o seguimento dos indivíduos, expressando as medidas obtidas ao longo do estudo. Foram utilizadas diferentes maneiras de definição da variação da cIMT tendo em vista não existir ainda a compreensão da evolução esperada para a faixa etária estudada. Foram utilizadas as diferenças absolutas entre as medidas no final do estudo (24 meses) e a medida inicial (entrada), a diferença entre os escores z destas medidas obtidos no início e final do estudo e a razão da medida obtida com 24m em relação à entrada.

As figuras mostradas a seguir expressam como cada uma das medidas analisadas se correlacionaram com as medidas de cIMT. Em cada uma das figuras são representados os valores médios dos diferentes momentos nos quais cada variável foi medida em relação à diferença entre as medidas absolutas da cIMT ao final do estudo e na entrada (Valor obtido aos 24 meses subtraído do valor obtido à entrada do estudo); a diferença entre os escores z calculados destas duas medidas (24m-entrada); a razão entre a (cIMT(24m)/cIMT(entrada)) multiplicadas por 100%; por fim os *box-plots* da distribuição dos valores de cada uma das variáveis nos indivíduos classificados como evoluído com cIMT abaixo do P75 (<P75) e acima deste valor (>P75). Observando-se essas figuras, nota-se que pode haver uma relação inversa entre sTNFR1 e HLADR⁺CD38⁺ e cIMT média.

Figura 10. Gráficos com a distribuição dos valores de *sTNFR* (ng/ml) em relação a *cIMT* média.

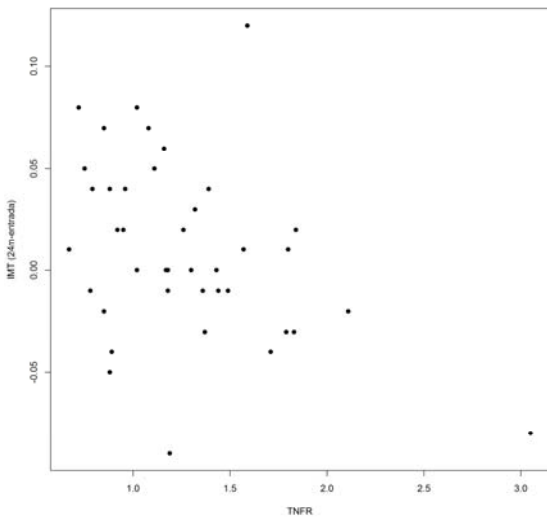


Figura 10a. Gráfico de dispersão dos valores médios de *sTNFR* em relação a diferença do valor absoluto de *cIMT* (24m-entrada).

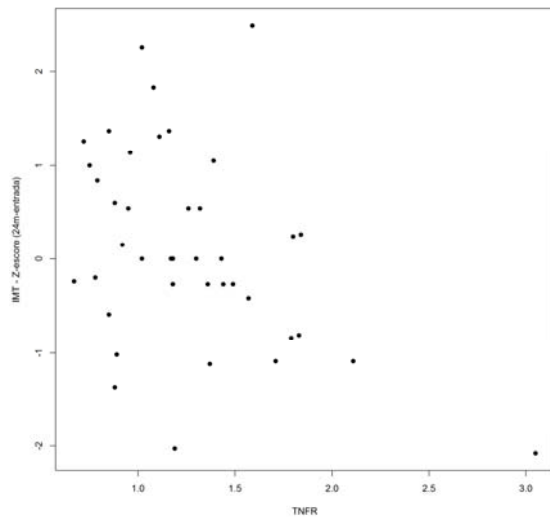


Figura 10b. Gráfico de dispersão dos valores médios de *sTNFR* em relação a diferença do valor de *escore z* de *cIMT* (24m-entrada).

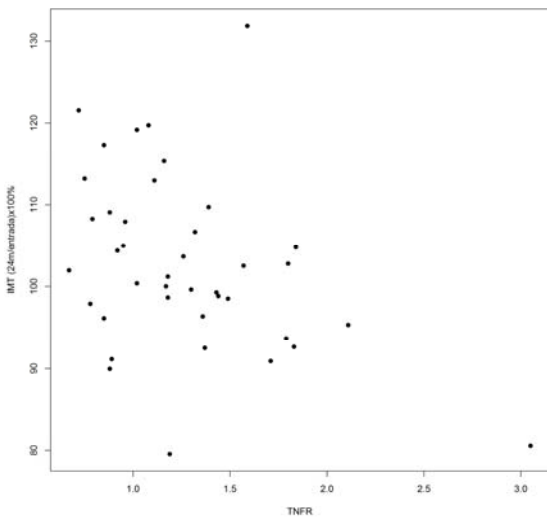


Figura 10c. Gráfico de dispersão dos valores médios de *sTNFR* em relação a razão de *cIMT* (24m/entrada)x100%.

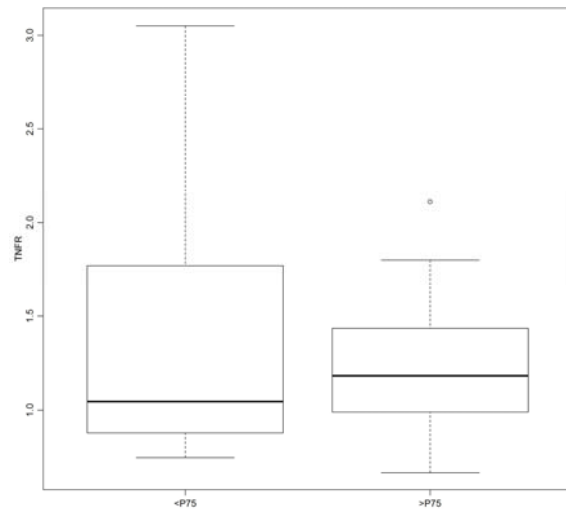


Figura 10d. *Box-plots* da distribuição dos valores médios de *sTNFR* para os indivíduos com *cIMT* abaixo do P75 e acima do P75.

Figura 11. Gráfico com a distribuição dos valores de $HLADR^+CD38^+$ (porcentagem - %) em relação a $cIMT$.

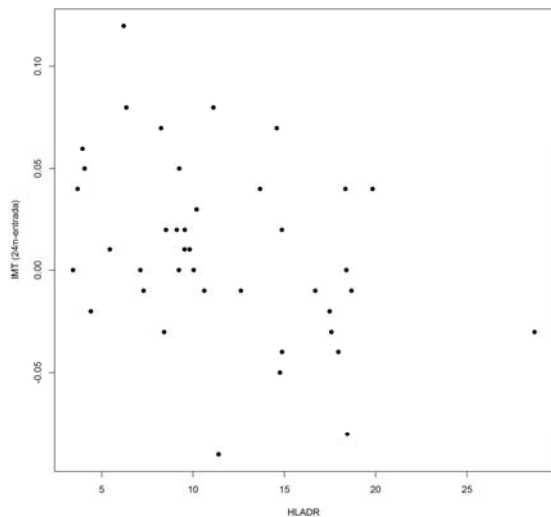


Figura 11a. Gráfico de dispersão dos valores médios de porcentagem de $HLADR^+CD38^+$ em relação a diferença do valor absoluto de $cIMT$ (24m-entrada).

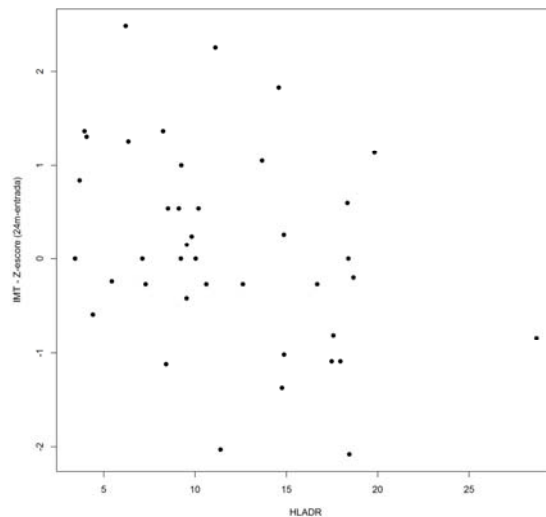


Figura 11b. Gráfico de dispersão dos valores médios de porcentagem de $HLADR^+CD38^+$ em relação a diferença do valor de *escore z* de $cIMT$ (24m-entrada).

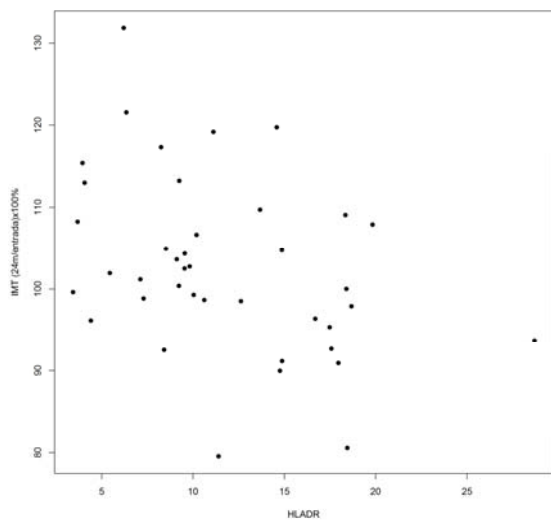


Figura 11c. Gráfico de dispersão dos valores médios de porcentagem de $HLADR^+CD38^+$ em relação a razão de $cIMT$ (24m/entrada)x100%.

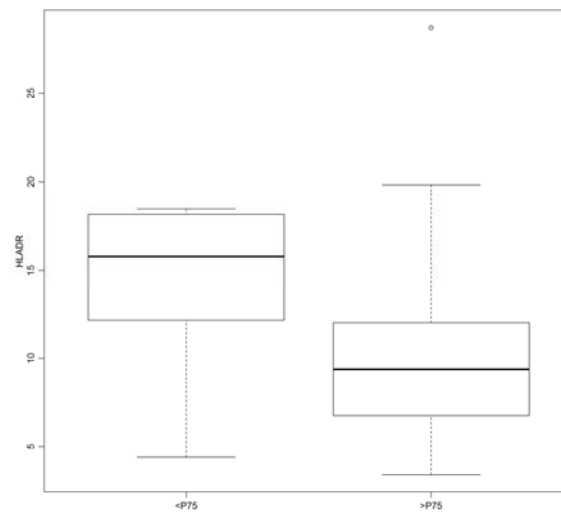


Figura 11d. *Box-plots* da distribuição dos valores médios de porcentagem de $HLADR^+CD38^+$ para os indivíduos com $cIMT$ abaixo do P75 e acima do P75.

Figura 12. Gráfico com a distribuição dos valores de *sCD14* (ng/ml) em relação a *cIMT*.

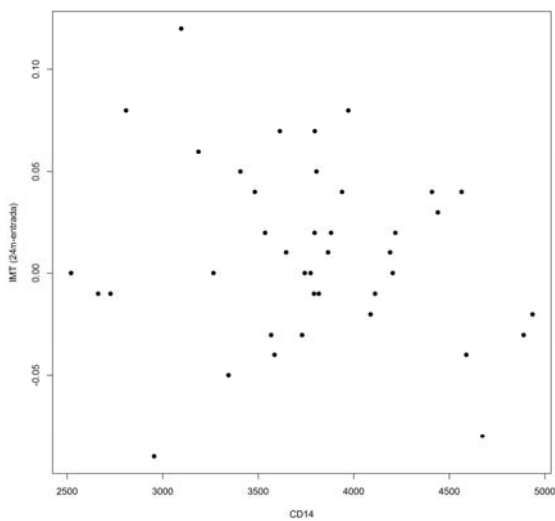


Figura 12a. Gráfico de dispersão dos valores médios de *sCD14* em relação a diferença do valor absoluto de *cIMT* (24m-entrada).

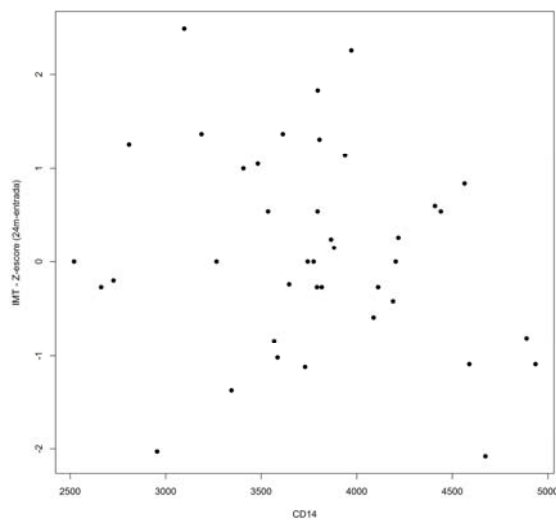


Figura 12b. Gráfico de dispersão dos valores médios de *sCD14* em relação a diferença do valor de *escore z* de *cIMT* (24m-entrada).

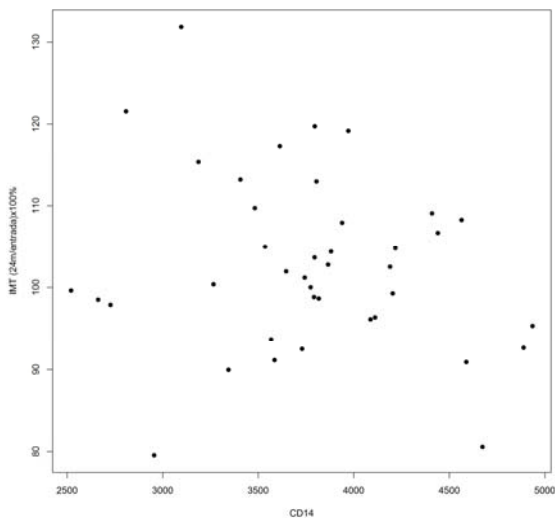


Figura 12c. Gráfico de dispersão dos valores médios de *sCD14* em relação a razão de *cIMT* (24m/entrada)x100%.

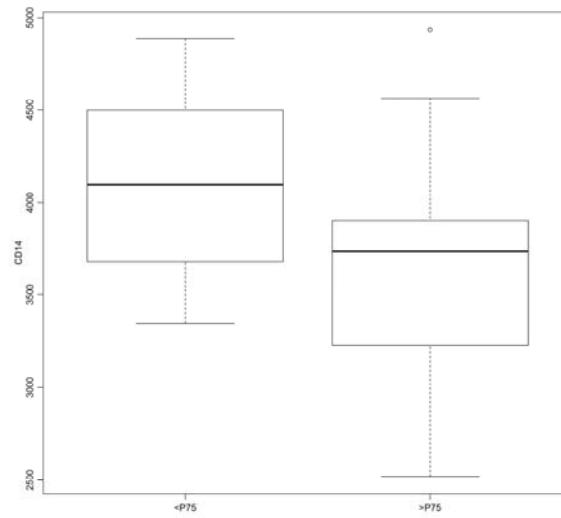


Figura 12d. *Box-plots* da distribuição dos valores médios de *sCD14* para os indivíduos com *cIMT* abaixo do P75 e acima do P75.

Figura 13. Gráfico com a distribuição dos valores de QuantiFERON-CMV (produção de interferon- α em UI/ml) em relação a cIMT.

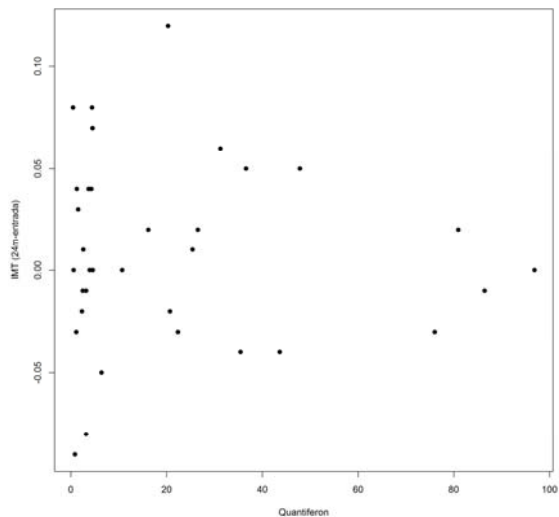


Figura 13a. Gráfico de dispersão dos valores médios de *QuantiFERON-CMV* em relação a diferença do valor absoluto de *cIMT* (24m-entrada).

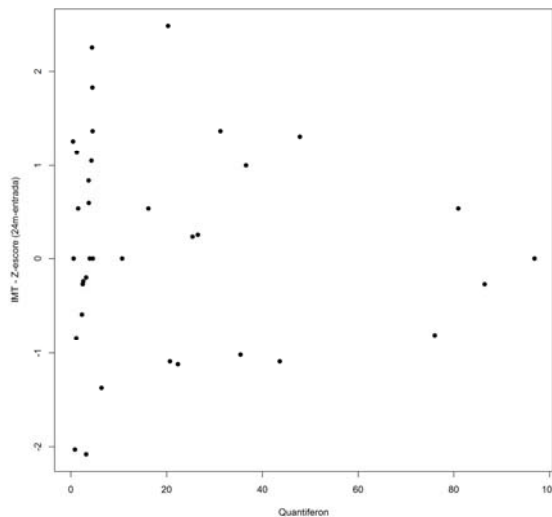


Figura 13b. Gráfico de dispersão dos valores médios de *QuantiFERON-CMV* em relação a diferença do valor de *escore z* de *cIMT* (24m-entrada).

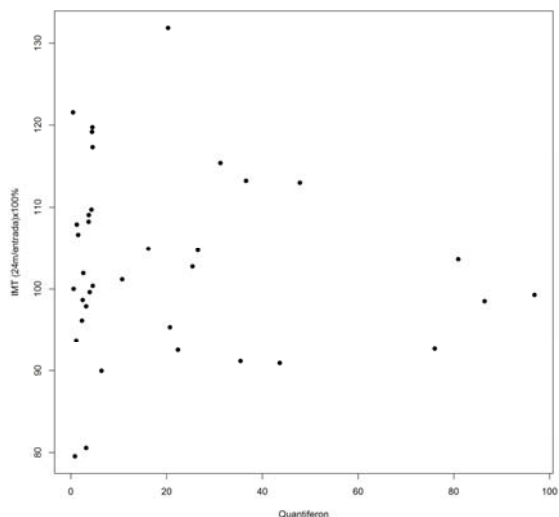


Figura 13c. Gráfico de dispersão dos valores médios de *QuantiFERON-CMV* em relação a razão de *cIMT* (24m/entrada)x100%.

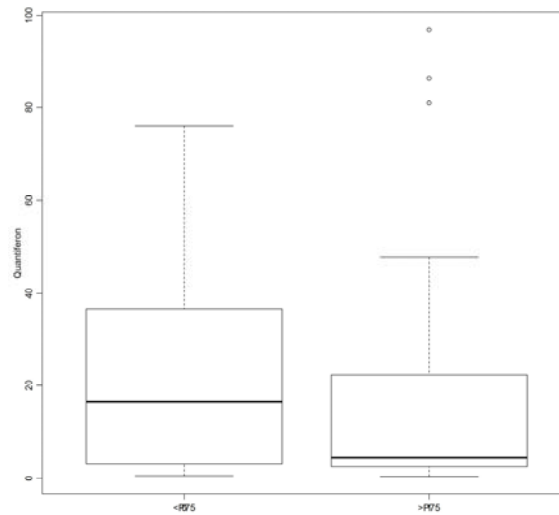


Figura 13d. *Box-plots* da distribuição dos valores médios de *QuantiFERON-CMV* para os indivíduos com *cIMT* abaixo do P75 e acima do P75.

Figura 14. Gráfico com a distribuição dos valores de CD4 (células/mm³) em relação a cIMT média.

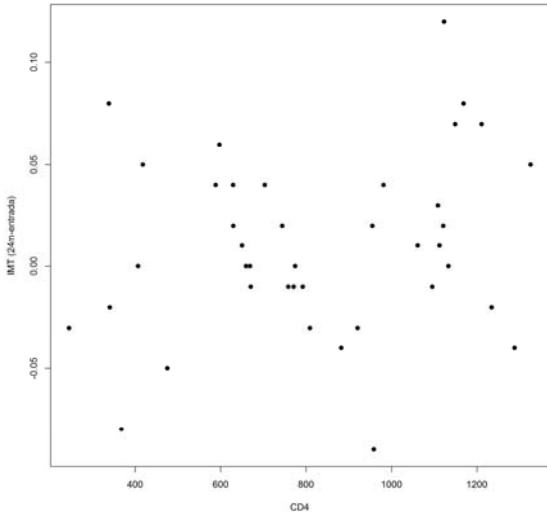


Figura 14a. Gráfico de dispersão dos valores médios de CD4 em relação a diferença do valor absoluto de cIMT (24m-entrada).

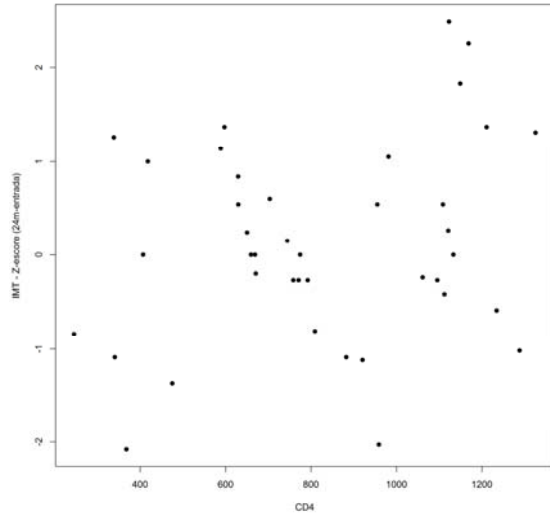


Figura 14b. Gráfico de dispersão dos valores médios de CD4 em relação a diferença do valor de *score z* de cIMT (24m-entrada).

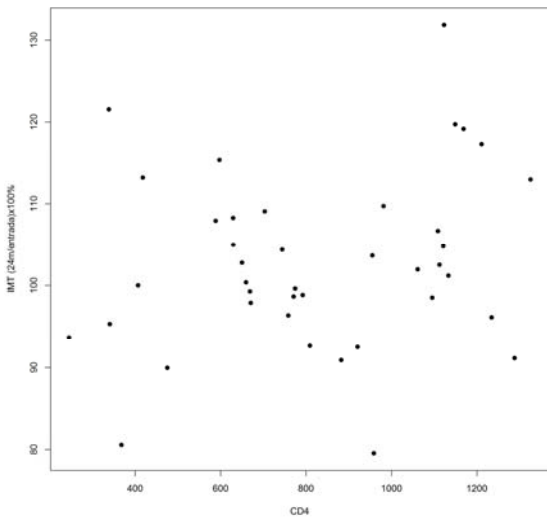


Figura 14c. Gráfico de dispersão dos valores médios de *Quantiferon-CMV* em relação a razão de cIMT (24m/entrada)x100%.

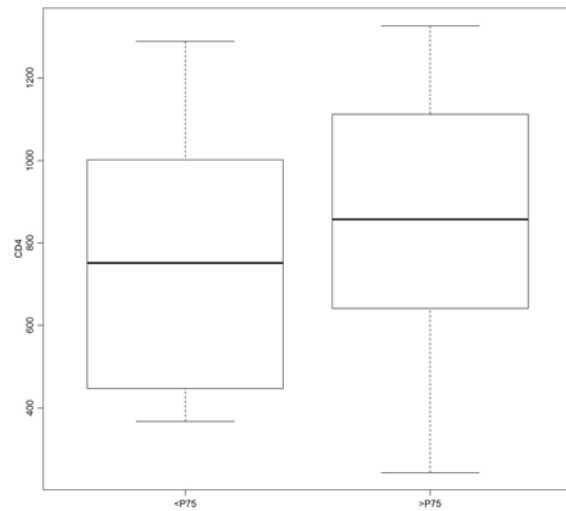


Figura 12d. *Box-plots* da distribuição dos valores médios de *Quantiferon-CMV* para os indivíduos com cIMT abaixo do P75 e acima do P75.

Figura 15. Gráfico com a distribuição dos valores de IgG-CMV (UI/ml) em relação a cIMT média.

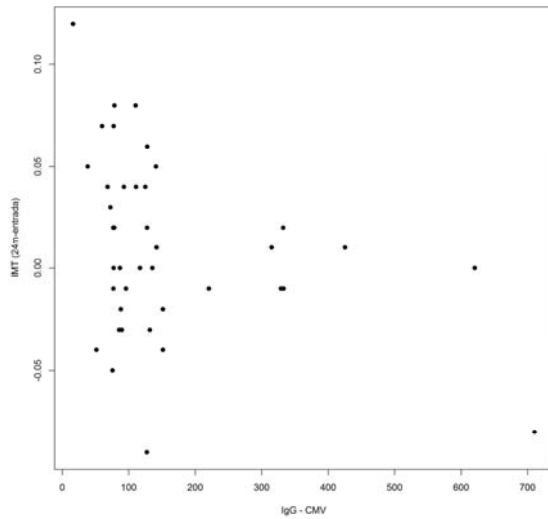


Figura 15a. Gráfico de dispersão dos valores médios de *IgG-CMV* em relação a diferença do valor absoluto de *cIMT* (24m-entrada).

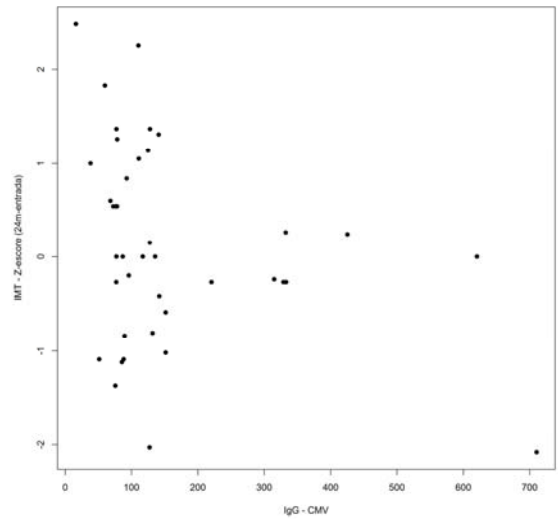


Figura 15b. Gráfico de dispersão dos valores médios de *IgG-CMV* em relação a diferença do valor de *escore z* de *cIMT* (24m-entrada).

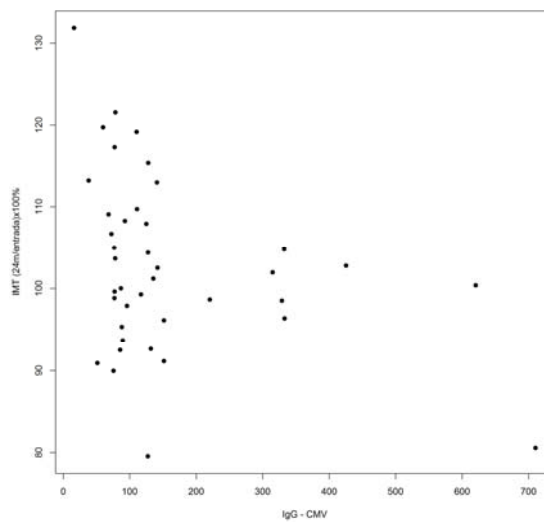


Figura 15c. Gráfico de dispersão dos valores médios de *IgG-CMV* em relação a razão de *cIMT* (24m/entrada)x100%.

A Tabela 17 mostra a distribuição de valores das variáveis previamente mostradas nas Figuras.

Tabela17. Distribuição das variáveis utilizadas na análise da associação.

| | Média (DP) | Mín./ Máx. | Mediana (P25-P75) |
|-------------------------------------|-------------------|-------------------|-----------------------------|
| Δ de cIMT (mm) | 0,01 (0,04) | -0,09/ 0,12 | 0,01 (-0,02 – 0,04) |
| Δ escore z cIMT | 0,12 (1,06) | -2,08/ 2,49 | 0,00 (-0,51 – 0,92) |
| Razão cIMT | 102,76 (10,77) | 79,54/ 131,84 | 101,56 (96,24 – 108,65) |
| sTNFR (ng/ml) | 1,27 (0,46) | 0,67/ 3,05 | 1,18 (0,91 – 1,46) |
| sCD14 (ng/ml) | 3766,10 (589,18) | 2520,89/ 4935,90 | 3793,80 (3445,12 – 4151,15) |
| HLADR+CD38+ (%) | 11,61 (5,61) | 3,43/ 28,70 | 10,12 (7,77 – 15,79) |
| Quantiferon-CMV (UI/ml) | 20,47 (26,82) | 0,45/ 96,88 | 4,56 (2,90 – 28,88) |
| IgG-CMV (UI/ml) | 159,41 (148,98) | 16,34/ 710,60 | 110,74 (77,40 – 146,80) |
| Razão IgG CMV (maior/menor) | 2,54 (2,31) | 1,15/ 9,53 | 1,48 (1,33 – 1,70) |
| CD4 (células/mm³) | 821,92 (297,04) | 245,43/ 1325,67 | 783,63 (629,88 – 1110,79) |

Δ de cIMT (mm): diferença dos valores absolutos de cIMT de 24 m – cIMT de entrada; Δ escore z cIMT: diferença de escore z de cIMT de 24m – escore z de cIMT de entrada; Razão cIMT: (cIMT 24m/cIMT entrada)x100%.

A Tabela 18 apresenta os resultados de modelos de análise de regressão simples e múltiplo buscando associação das variáveis indicadas com a diferença de medida da cIMT obtida entre o final (24m) e a entrada no estudo (Δ). Observou-se que os marcadores sTNFR e HLADR+CD38+ se associaram estatisticamente com o Δ dos valores absolutos da cIMT, de tal modo que, para o aumento de uma unidade de sTNFR, tem-se uma queda de -0,03 no Δ , mesmo após o ajuste pelos valores de linfócitos CD4+. Ao mesmo tempo, para o aumento de uma unidade do HLADR+CD38+, têm-se uma queda de -0,0027 no Δ , mesmo após o ajuste pelos valores de linfócitos CD4+.

Tabela 18. Modelo de Regressão Linear Simples e múltiplo para avaliar as associações das variáveis de interesse com a diferença dos valores absolutos de cIMT (cIMT 24m – cIMT entrada).

| Variável | Delta Valores Absolutos - Média | | | | | | | |
|----------------------------|---------------------------------|-------------|----------|---------|-----------------------|-------------|----------|---------|
| | Modelo simples | | | | Modelo ajustado (CD4) | | | |
| | Estimat. | p-valor | IC95% | | Estimat. | p-valor | IC95% | |
| LI | | | LS | LI | | | LS | |
| sTNFR (ng/ml) | -0,04 | 0,01 | -0,06 | -0,01 | -0,03 | 0,02 | -0,06 | -0,01 |
| sCD14 (ng/ml) | -0,00001 | 0,33 | -0,00003 | 0,00001 | -0,00001 | 0,34 | -0,00003 | 0,00001 |
| HLADR+CD38+ (%) | -0,0030 | 0,01 | -0,0050 | -0,0006 | -0,0027 | 0,04 | -0,0050 | -0,0002 |
| QuantiFERON (UI/ml) | -0,0001 | 0,66 | -0,0007 | 0,0004 | -0,0002 | 0,52 | -0,0008 | 0,0004 |
| IgG CMV_razao (<4) | 0,02 | 0,17 | -0,01 | 0,06 | 0,02 | 0,18 | -0,01 | 0,06 |
| QuantiFERON | -0,01 | 0,71 | -0,05 | 0,04 | -0,01 | 0,62 | -0,05 | 0,03 |
| CV_HIV | -0,02 | 0,28 | -0,05 | 0,01 | -0,01 | 0,40 | -0,04 | 0,02 |
| Lipdograma | 0,01 | 0,55 | -0,02 | 0,04 | 0,005 | 0,77 | -0,03 | 0,04 |
| HOMA IR | 0,02 | 0,25 | -0,01 | 0,04 | 0,02 | 0,18 | -0,01 | 0,05 |
| CD4 (cél/mm ³) | 0,00003 | 0,21 | -0,00002 | 0,00008 | * | * | * | * |

LI: limite inferior do intervalo; LS: limite superior do intervalo; IC: intervalo de confiança; Estimat.: estimativa

Utilizando-se como desfecho a diferença entre os escores z calculados para as medidas de cIMT no final (24m) e na entrada no estudo, observou-se que sTNFR se associou estatisticamente com o Δ dos z-escores da cIMT, de tal modo que, para o aumento de uma unidade de sTNFR, tem-se um queda de -0,86 no Δ , mesmo após o ajuste pelos valores de linfócitos CD4+, ou seja, valores mais elevados desse marcador se associaram com menor progressão do cIMT. Com relação ao HLADR+CD38+, após o ajuste pelos valores de linfócitos CD4+, não foi mais observada associação com o Δ dos z-escores da cIMT

Tabela 19. Modelo de Regressão Linear Simples e múltiplo para avaliar as associações das variáveis de interesse com a diferença dos escores z de cIMT.

| Variável | Delta Z-escore - Média | | | | | | | |
|----------------------------|------------------------|---------|----------|---------|-----------------------|---------|----------|---------|
| | Modelo simples | | | | Modelo ajustado (CD4) | | | |
| | Estimat. | p-valor | IC95% | | Estimat. | p-valor | IC95% | |
| LI | | | LS | LI | | | LS | |
| sTNFR (ng/ml) | -0,93 | < 0,01 | -1,62 | -0,24 | -0,86 | 0,01 | -1,56 | -0,16 |
| sCD14 (ng/ml) | -0,00030 | 0,24 | -0,00090 | 0,00024 | -0,00030 | 0,25 | -0,00090 | 0,00024 |
| HLADR+CD38+ (%) | -0,07 | 0,02 | -0,12 | -0,01 | -0,06 | 0,06 | -0,12 | 0,004 |
| QuantiFERON (UI/ml) | -0,002 | 0,75 | -0,02 | 0,01 | -0,004 | 0,57 | -0,02 | 0,01 |
| IgG CMV_razao (<4) | 0,53 | 0,19 | -0,27 | 1,34 | 0,51 | 0,20 | -0,28 | 1,31 |
| QuantiFERON | 0,06 | 0,90 | -0,98 | 1,10 | -0,01 | 0,98 | -1,05 | 1,03 |
| CV_HIV | -0,42 | 0,25 | -1,16 | 0,31 | -0,32 | 0,38 | -1,07 | 0,42 |
| Lipdograma | 0,21 | 0,61 | -0,61 | 1,03 | 0,06 | 0,87 | -0,77 | 0,90 |
| HOMA IR | 0,39 | 0,25 | -0,28 | 1,07 | 0,46 | 0,17 | -0,21 | 1,13 |
| CD4 (cél/mm ³) | 0,0008 | 0,14 | -0,0003 | 0,0019 | * | * | * | * |

LI: limite inferior do intervalo; LS: limite superior do intervalo; IC: intervalo de confiança; Estimat.: estimativa

Quando considerada a razão entre os valores final (24m) e inicial (entrada) de cIMT sTNFR e HLADR+CD38+ se associaram estatisticamente com razão [(24m/Entrada) x100%] da cIMT, de tal modo que, para o aumento de uma unidade de sTNFR, tem-se queda de -8,44% na razão, mesmo após o ajuste pelo CD4. Ao mesmo tempo, para o aumento de uma unidade do HLADR+CD38+, tem-se uma queda de -0,69% na razão, mesmo após o ajuste pelo CD4.

Tabela 20. Modelo de Regressão Linear Simples e múltiplo para avaliar as associações das variáveis de interesse com a razão dos valores de cIMT (24m/entrada)x100%.

| Variável | Razão 24m/Entrada - Média | | | | | | | |
|-------------------------------|---------------------------|-------------|----------|---------|-----------------------|-------------|----------|---------|
| | Modelo simples | | | | Modelo ajustado (CD4) | | | |
| | Estimat. | p-valor | IC95% | | Estimat. | p-valor | IC95% | |
| LI | | | LS | LI | | | LS | |
| sTNFR (ng/ml) | -9,07 | 0,01 | -16,11 | -2,02 | -8,44 | 0,02 | -15,63 | -1,26 |
| sCD14 (ng/ml) | -0,00300 | 0,22 | -0,00900 | 0,00200 | -0,00300 | 0,23 | -0,00900 | 0,00200 |
| HLADR+CD38+ (%) | -0,74 | 0,01 | -1,32 | -0,16 | -0,69 | 0,03 | -1,32 | -0,05 |
| QuantiFERON (UI/ml) | -0,04 | 0,61 | -0,18 | 0,11 | -0,05 | 0,48 | -0,19 | 0,09 |
| IgG | | | | | | | | |
| CMV_razao (<4) | 5,92 | 0,15 | -2,20 | 14,06 | 5,78 | 0,15 | -2,28 | 13,85 |
| QuantiFERON | -1,96 | 0,71 | -12,57 | 8,64 | -2,68 | 0,61 | -13,33 | 7,97 |
| CV_HIV | -4,14 | 0,27 | -11,64 | 3,35 | -3,26 | 0,39 | -10,91 | 4,38 |
| Lipdograma | 2,72 | 0,51 | -5,59 | 11,03 | 1,44 | 0,73 | -7,11 | 10,01 |
| HOMA IR | 3,96 | 0,25 | -2,92 | 10,87 | 4,59 | 0,18 | -2,24 | 11,44 |
| CD4 (cél/mm ³) | 0,008 | 0,19 | -0,0039 | 0,019 | * | * | * | * |

LI: limite inferior do intervalo; LS: limite superior do intervalo; IC: intervalo de confiança; Estimat.: estimativa.

Na Tabela 21, mostra-se que sCD14 e HLADR+CD38+ se associaram estatisticamente com a diferenciação em grupos <P75 e >P75 da cIMT, de tal modo que os valores de cIMT dentro da normalidade (<P75) se associaram a níveis de sCD14 mais altos (diferença de 450,19 ng/ml) e a níveis de HLADR+CD38+ mais altos (diferença de 4,26%), mesmo após o ajuste pelo CD4. A diferença entre as médias de HLADR+CD38+ foi de 3,75 após o ajuste pelo CD4.

Tabela 21. Modelo de Regressão Linear Simples e múltiplo para avaliar as associações das variáveis de interesse com a classificação de cIMT em <P75 e >P75.

| Modelo simples | | | | |
|--|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|
| Diferença entre médias (<P75 - | | | | |
| Variável | >P75) | p-valor | LI IC95% | LS IC95% |
| sTNFR (ng/ml) | 0,11 | 0,49 | -0,21 | 0,43 |
| sCD14 (ng/ml) | 450,19 | 0,02 | 60,37 | 840 |
| HLADR ⁺ CD38 ⁺ (%) | 4,26 | 0,02 | 0,54 | 7,97 |
| QuantiFERON-CMV (UI/ml) | 4,12 | 0,68 | -16,4 | 24,64 |
| CD4 (cél./mm ³) | -77,65 | 0,46 | -286,29 | 130,97 |
| Modelo múltiplo (CD4) | | | | |
| Diferença entre médias (<P75 - | | | | |
| Variável | >P75) | p-valor | LI IC95% | LS IC95% |
| sTNFR (ng/ml) | 0,09 | 0,58 | -0,23 | 0,42 |
| sCD14 (ng/ml) | 453,61 | 0,03 | 55,37 | 851,84 |
| HLADR ⁺ CD38 ⁺ (%) | 3,75 | 0,03 | 0,22 | 7,28 |
| QuantiFERON-CMV (UI/ml) | 5,05 | 0,62 | -15,62 | 25,73 |
| CD4 (cél./mm ³) | * | * | * | * |

LI: limite inferior do intervalo; LS: limite superior do intervalo; IC: intervalo de confiança

A tabela 22 apresenta os resultados da análise das associações entre os grupos >P75 e <P75 de cIMT e as variáveis categóricas. Não foi encontrada associação entre as variáveis estudadas e a cIMT neste modelo.

Tabela 22. Frequências de resultados encontrados para as variáveis categóricas estudadas por grupo e risco relativo para a análise da associação com a cIMT.

| | ALTERAÇÃO DE cIMT | | Total |
|--|-------------------|------------|-------|
| | <P75 | >P75 | |
| QuantiFERON-CMV | | | |
| REATIVO | 10 (29.41) | 24 (70.59) | 34 |
| NÃO REATIVO | 2 (40.00) | 3 (60.00) | 5 |
| <i>RR (IC95%) = 0,85 (0,40; 1,79)</i> | | | |
| <i>RRaj (IC95%) = 0,87 (0,41; 1,87)</i> | | | |
| Quantificação da CV DO HIV | | | |
| Sem escape viral * | 5 (41.67) | 7 (58.33) | 12 |
| Com escape viral | 7 (25.00) | 21 (75.00) | 28 |
| <i>RR (IC 95%) = 1,29 (0,76; 2,17)</i> | | | |
| <i>RRaj (IC 95%) = 1,26 (0,75; 2,13)</i> | | | |
| Dislipidemia | | | |
| Sem alteração | 2 (22.22) | 7 (77.78) | 9 |
| Com alteração | 10 (32.26) | 21 (67.74) | 31 |
| <i>RR (IC 95%) = 0,87 (0,57; 1,33)</i> | | | |
| <i>RRaj (IC 95%) = 0,90 (0,58; 1,42)</i> | | | |
| HOMA-IR | | | |
| Sem alteração | 6 (27.27) | 16 (72.73) | 22 |
| Com alteração | 6 (33.33) | 12 (66.67) | 18 |
| <i>RR (IC 95%) = 0,92 (0,61; 1,39)</i> | | | |
| <i>RRaj (IC 95%) = 0,81 (0,49; 1,35)</i> | | | |
| Razão IgG-CMV (maior/ menor) | | | |
| <4 | 9 (29.03) | 22 (70.97) | 31 |
| ≥4 | 3 (33.33) | 6 (66.67) | 9 |
| <i>RR (IC 95%) = 0,94 (0,56; 1,57)</i> | | | |
| <i>RRaj (IC 95%) = 0,95 (0,57; 1,57)</i> | | | |

RR: risco relativo; RRaj: risco relativo ajustado

4. DISCUSSÃO

Ao estudarmos crianças e adolescentes infectados pelo HIV e testarmos a hipótese de que a infecção recorrente pelo Citomegalovírus e/ou os indícios imunológicos que essa tivesse ocorrido, pudesse influenciar a ocorrência de lesões vasculares precedentes ao desenvolvimento de aterosclerose, caracterizamos os seus fatores de risco cardiovascular, pois, a presença desses sabidamente poderia influenciar o desfecho por nós estudado: a espessura das camadas média e íntima de artérias carótidas. De maneira geral, O grupo por nós estudado se caracterizou por apresentar baixa prevalência de fatores de risco cardiovascular, exceto pela presença de alterações de perfil lipídico que estava permanentemente presente em 92,5% dos adolescentes, provavelmente como consequência tanto da própria infecção pelo HIV quanto dos efeitos colaterais das medicações antirretrovirais, que aumentam a prevalência desta alteração nos indivíduos infectados pelo vírus HIV⁽⁴⁷⁾. Neste aspecto incluem-se os inibidores de protease que são a classe de drogas que mais tem se associado à dislipidemia e que a maioria dos participantes se encontravam em uso, embora outros antirretrovirais, como os inibidores da transcriptase reversa análogos nucleosídeos, também já tenham sido implicados nestas alterações⁽¹²¹⁾.

Além disso, embora nenhum participante tenha sido diagnosticado com diabetes, 45% das crianças apresentaram, em avaliação única, indícios de já apresentarem resistência insulínica como sugerido pelos resultados obtidos no índice HOMA-IR. Apesar de ainda não serem estabelecidos critérios bem definidos para o diagnóstico de resistência à insulina pelo HOMA IR e a Hemoglobina glicosilada não ser recomendada como teste de triagem para diabetes, ambos vem sendo utilizada para avaliação do metabolismo da glicose nesta população e são importantes porque a resistência insulínica é um fator de risco para o desenvolvimento futuro de diabetes⁽¹²²⁾.

Com relação à infecção pelo HIV o grupo consistia, em sua maioria, de crianças e adolescentes com bom controle da infecção. Durante o seguimento, essas não se encontravam em estado de imunossupressão grave, exceto por uma criança que manteve a contagem e a porcentagem de células CD4 permanentemente abaixo dos limites mínimos. A maioria dos participantes possuía controle da viremia pelo HIV e manteve-se assim ao longo do estudo. No entanto, pouco mais da metade apresentava a relação de células CD4+/CD8+ abaixo de 1, indicando já terem sofrido previamente comprometimento do equilíbrio

adequado do sistema imunológico, com expansão de células CD8+ em relação a CD4+, prejuízo na recuperação do número destas e possivelmente um maior número de células efectoras/*naive* em relação ao esperado para a idade⁽¹²³⁾. Isto indica que apesar de constituírem um grupo com bom controle da doença pelo HIV quando de sua participação no estudo, já tinham indícios de terem sofrido comprometimento imunológico devido à infecção por esse vírus.

A incidência de viremia do Citomegalovírus por nós detectada nessas crianças por meio da técnica de RT-PCR para CMV foi menor do que a encontrada em outros estudos, como descritos na introdução deste trabalho. Este achado pode ser explicado pelo fato de que os citados estudos avaliaram maior número de indivíduos que, em sua maioria, se encontravam em estado de imunossupressão no momento da avaliação. No presente estudo, entre os 47 indivíduos avaliados para identificação da recorrência viral havia 3 indivíduos com persistente imunossupressão grave e somente 1 apresentou viremia identificada, evoluindo com doença pelo CMV e óbito. Além deste aspecto, um dos citados autores⁽⁸¹⁾ avaliou crianças africanas entre 3 semanas e 2 anos de idade em aleitamento materno, período de alto risco de exposição ao citomegalovírus em uma população de alta prevalência dessa infecção, o que diferencia as características de exposição dos mesmos em relação ao grupo por nós estudado, que apesar de viverem em população de alta soroprevalência para o CMV, tinham maior idade e provavelmente já haviam adquirido a infecção primária por CMV, apesar de não terem sido amamentados. Os demais estudos envolveram indivíduos de mais idade, tendo já sido documentado que com o avanço da idade a chance de recorrência viral pelo CMV é maior.

Não há na literatura estudos prévios sobre a recorrência viral pelo CMV em adolescentes infectados pelo HIV em tratamento antirretroviral. A baixa incidência identificada por nós pode ser também explicada pela possibilidade de recorrência sérica por curto período. Como obtivemos amostras com o intervalo de 3 meses, poderia não ter sido viável a identificação da real frequência de reativações, podendo esta ter ocorrido nos intervalos das avaliações. Isso é corroborado pela observação que nos exames que identificaram a recorrência viral, com exceção do participante que apresentou doença pelo CMV, a repetição em curto período após o exame inicial resultou negativa, com o menor intervalo de avaliação de 12 dias.

Como a replicação do CMV persiste por mais tempo em outros sítios, tais como a saliva e a urina, a avaliação da excreção viral nestes locais poderia complementar a avaliação da recorrência de infecção. Entretanto, não revelaria a recorrência sistêmica e sim local nesses

tecidos. Dessa forma, utilizamos os títulos de anticorpos IgG contra o CMV e a imunidade específica contra este vírus avaliada por meio do QuantiFEROn-CMV como marcadores indiretos da recorrência de viremia, ou, ao contrário, como protetores para a ocorrência desta, no entanto não é possível inferir a respeito disto neste estudo. Os poucos indivíduos que apresentaram recorrência identificada pela detecção do DNA viral, exceto o que evoluiu para óbito, não apresentaram elevação de títulos de anticorpos ao longo do seguimento e ambos apresentavam reatividade da imunidade celular específica, com títulos de Interferon- γ semelhantes à maioria dos demais participantes do estudo.

A avaliação da espessura da íntima e média da artéria carótida (cIMT) foi o método escolhido para avaliação do risco cardiovascular das crianças e adolescentes no estudo, pois está associada ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares na vida adulta^(124,125). Embora o aumento da espessura destas camadas da parede arterial possa ser decorrentes de adaptações fisiológicas a mudanças do fluxo sanguíneo local e não representem diretamente alterações iniciais da aterosclerose⁽¹²⁶⁾, essa variável vem sendo usada como indicadora do risco aterosclerótico, pois, em crianças, a avaliação exclusiva da presença da placa aterosclerótica não permite a identificação dos pacientes com dano cardiovascular porque esta lesão habitualmente se desenvolve em idades mais avançadas, embora o rastreamento dos vasos para a identificação desta esteja incluída no procedimento de medida da cIMT.

A avaliação da cIMT é uma medida não invasiva, de baixo risco, que possui reprodutibilidade e há possibilidade de análise da sua variação ao longo do tempo. Devido ao seu amplo uso em estudos com crianças e adolescentes foram estabelecidos por diferentes autores valores de referência para esta medida na faixa etária adolescente, que possibilitam a análise das variações de populações específicas, como as crianças e adolescentes HIV(+). Para o cálculo dos escores z a referência escolhida neste estudo foi a proposta por Doyon e colaboradores⁽³⁴⁾, por ter sido obtida em um grupo populacional maior em relação aos demais estudos de referência disponíveis^(33,35,127), embora as medidas tenham sido obtidas manualmente por esses autores, o que pode comprometer sua precisão.

Utilizamos os valores de referência para sexo e estatura considerando possíveis diferenças corporais presentes nas crianças com infecção pelo HIV, que podem estar presentes com a utilização das referências por idades. A análise pelas diferenças absolutas das medidas e pela diferença dos escores z obtidos em cada avaliação possibilitou analisar as

associações tanto em relação à evolução da medida como em relação aos valores considerados como normais^(128,129).

Os adolescentes por nós estudados apresentaram evolução não linear da progressão da espessura das camadas intima-média das artérias carótidas ao longo de período de observação, havendo indivíduos que diminuíram estas medidas, aumentaram, ou mesmo apresentaram progressões opostas entre as avaliações do primeiro e do segundo ano, refletindo a influência de uma conjunção de fatores que podem atuar sobre as adaptações vasculares e suas mudanças estruturais. A média das medidas do grupo não demonstrou mudança significativa ao longo do seguimento mesmo controlando a análise com o estadiamento puberal e a estatura, no caso dos valores absolutos.

Comparativamente à referência utilizada, os indivíduos se encontravam em sua maioria com valor acima da média, sendo que a maioria atingiu valores acima do percentil 75 dessa distribuição ao longo do seguimento, nível habitualmente recomendado para indicar valores de cIMT maior que o esperado e que indicam um sinal de alerta⁽³⁷⁾. No entanto, se considerarmos que a população de referência possui condições socioambientais e biológicas diferentes do grupo estudado e isto pode refletir na interpretação dos nossos resultados. Os valores de referência definidos por Sass et al⁽¹²⁷⁾ consistem de medidas mais elevadas que a utilizada no presente estudo, o que poderia refletir em resultados diferentes dos apresentados no cálculo de escores z.

Para considerar os valores acima do percentil 75 como alterados, idealmente seria importante que tivéssemos valores de referência com uma amostragem mais ampla, ou um grupo controle que representasse as características da população ao qual a avaliação será aplicada, como foi proposto para a avaliação das medidas em adultos. No entanto, para os adolescentes ainda há dificuldades em compreender como a evolução desta medida se processa com as mudanças corporais e discute-se se não haveria outros parâmetros de medidas que fossem mais adequados para a definição de alterações precoces associadas à aterosclerose, tais como a avaliação da irregularidade arterial ao longo de um seguimento da artéria carótida comum⁽³⁶⁾. A associação da cIMT com a aterosclerose e com as doenças cardiovasculares em adultos já foi demonstrada, assim como a associação da presença de fatores de risco na infância e adolescência com o seu aumento na idade adulta, no entanto o seu uso como medida de alterações precoces da aterosclerose em crianças e adolescentes ainda é alvo de discussões. A influência que as mudanças corporais que se processam com o

desenvolvimento puberal talvez dificultem avaliar variações pequenas nestas medidas. No presente estudo, metade dos participantes passaram pelas mudanças corporais da puberdade ao longo do período de seguimento, o que pode ter refletido na análise da evolução das medidas ultrassonográficas. Além disso, o período de 2 anos de seguimento pode ter sido insuficiente para avaliar a variação da espessura e utilizá-la na diferenciação entre aqueles que tiveram maior progressão daqueles que tiveram menor, como proposto no presente trabalho.

Outro aspecto que é importante ressaltar é que estudos prévios demonstraram não haver diferenças significantes entre a cIMT de indivíduos com HIV e indivíduos sem a infecção em crianças e adolescentes⁽¹³⁰⁾ e também em adultos⁽¹³¹⁾. Isto pode significar que o impacto da infecção e seus fatores particulares no desenvolvimento da aterosclerose não se expressam em mudança da espessura da camada íntima e média das artérias carótidas e, portanto, esta medida pode não ser o melhor parâmetro a ser utilizado para avaliação do desenvolvimento da aterosclerose neste grupo. Isto explicaria também o fato do indivíduo que desenvolveu uma lesão de placa aterosclerótica não ter apresentado aumento da cIMT durante o seguimento nem mesmo espessamento indicativo de risco em relação aos valores de referência (manteve valores abaixo do percentil 75). No entanto, os mecanismos fisiopatológicos que resultam no espessamento não são definidos como necessariamente uma etapa do processo de formação da placa, podendo refletir adaptações fisiológicas a alterações hemodinâmicas do vaso, como já discutido anteriormente⁽¹²⁶⁾.

Com relação ao manejo clínico, a identificação de um indivíduo com placa aterosclerótica no exame ultrassonográfico corrobora que as lesões ateroscleróticas avançadas possam se desenvolver já na adolescência, sendo importante a abordagem mais precoce possível dos fatores de risco tanto na prevenção primária como no tratamento destes, o que pode resultar em melhor qualidade de vida e sobrevida a longo prazo⁽²²⁾, podendo impactar na formação da aterosclerose ainda num momento em que as alterações sejam reversíveis.

Com relação aos resultados das medidas dos marcadores inflamatórios analisados, o papel principal dos receptores da molécula de TNF consiste na regulação da atividade do TNF- α , inativando sua ação em sítios específicos e também controlando os níveis séricos desta citocina. Compreende-se que em situações de grande produção desta segue-se a liberação dos receptores expressos principalmente nas células T que são ativadas, podendo ser

utilizados na quantificação da magnitude da resposta inflamatória. Essa análise vem sendo utilizada na caracterização da ativação imunológica que ocorre durante a infecção pelo HIV⁽¹³²⁾ e há estudos demonstrando associação da quantificação deste receptor com alterações cardiovasculares precoces^(133,134).

A translocação bacteriana nos pacientes infectados pelo HIV, que permanece mesmo com uso de antirretrovirais, é o principal fator de ativação dos monócitos e macrófagos. A avaliação da magnitude da ativação imune decorrente desta geralmente é avaliada pela quantificação de CD14 solúvel sérico, marcador principal de ativação da linhagem monocitária. Os macrófagos são essenciais para a formação da lesão aterosclerótica, havendo interesse também em investigar a relação dos níveis de sCD14 com o desenvolvimento desta, já havendo evidências de possível associação^(8,135).

No presente estudo as crianças e adolescentes apresentaram em geral níveis séricos de sTNFR1 dentro dos limites considerados normais, refletindo um estado de equilíbrio na produção e controle desta citocina. Já com relação à dosagem de sCD14 a maioria das avaliações revelaram altos níveis desta molécula. Outros trabalhos já demonstraram que as crianças e adolescentes infectados pelo vírus HIV mantêm níveis elevados deste marcador em relação a indivíduos não infectados, mesmo com o bom controle da infecção. Isto pode sugerir que neste grupo de crianças e adolescentes a translocação bacteriana e a disbiose intestinal possuem maior impacto na estimulação inflamatória crônica do que a ação do TNF⁽¹⁴⁾.

Estudo prévio já havia demonstrado não existir diferenças entre os níveis de sTNFR entre crianças e adolescentes infectados pelo vírus HIV com bom controle da infecção em relação a crianças e adolescentes não infectados, não havendo também evidências de associação deste parâmetro com a medida da cIMT⁽⁴⁹⁾.

O Quantiferon-CMV^R mostrou-se equivalente ao ELISPOT para CMV, técnica habitualmente utilizada na avaliação da imunidade celular a este vírus⁽¹³⁶⁾. Como nas crianças por nós estudadas prevaleceu a presença de resultado reativo no exame, com a maioria apresentando níveis abaixo de 10UI/ml de produção de Interferon alfa, a amostra apresentou pouca variabilidade com relação a este teste, o que pode ter interferido na identificação desta medida como fator de risco, embora existam trabalhos que não identificaram associação do CMV com alterações de cIMT⁽¹³⁷⁾.

Na análise dos possíveis fatores que influenciaram o aumento da medida da cIMT não foram identificadas associações entre indicadores de resposta imunológica ao CMV, seja da

QUANTIFERON ou dos níveis de anticorpos IgG anti-CMV e variações da cIMT. Dessa maneira, a nossa principal hipótese, de que a ativação imunológica específica ao CMV, como marcador de recorrência dessa infecção seria associada a incremento da espessura da íntima e média arterial ao longo de dois anos não pode ser aceita. Adicionalmente, apesar de terem sido identificadas associações estatísticas entre indicadores de ativação imunológica inespecífica (sTNRFI, sCD14 e/ou HLADR+CD38+) essas associações podem não se apresentar como clinicamente relevantes no presente trabalho.

Avaliando a associação encontrada com sTNFR é importante ressaltar que o grupo estudado apresentava níveis deste marcador dentro da faixa considerada normal, portanto as variações encontradas podem ser decorrentes da influência de outros aspectos não considerados nesta análise, como as mudanças funcionais das células T com a progressão para o “envelhecimento” do sistema imunológico.

Com relação ao sCD14 que houve diferença entre as médias dos grupos classificados com cIMT <P75 e >P75, a diferença encontrada é pequena (450,19) em relação aos níveis apresentados desta variável. E para o HLADR+CD38+ as estimativas de alteração de cIMT são muito baixas tanto em valores absolutos (0,0030mm), como em escore z (0,07) e porcentagem (0,74%). Além disso a diferença encontrada nas médias dos grupos de cIMT também foi baixa (4,26). Estes achados com relação aos marcadores de ativação imunológica não corroboraram a nossa hipótese e ainda vai contra a mesma.

Nosso estudo foi limitado pelo relativo pequeno tamanho amostral e pela falta de valores de referência populacional para medidas de cIMT. Idealmente, deveríamos comparar os achados em crianças HIV(+)/CMV(+) a grupos controle HIV(-)/CMV(+) e HIV(+)/CMV(-) para diferenciar os impactos da coinfeção. No entanto, a maioria de crianças em nosso meio é infectada pelo CMV precocemente, dificultando a segunda abordagem. Também, o grupo estudado era predominantemente homogêneo quanto a variáveis relativas aos fatores de risco cardiovascular, à infecção pelo HIV e pelo CMV, o que pode ter limitado o poder de discriminação do estudo. Ainda, o período de dois anos pode não ter sido suficiente para identificar alterações significativas na espessura das camadas íntima e média arteriais.

Independentemente dessas limitações, há na literatura somente um estudo que avaliou crianças infectadas pelo HIV numa abordagem longitudinal das alterações vasculares. Nosso estudo, portanto, possui relevância neste sentido, com a abordagem ao longo de dois anos de adolescentes em uso de antirretroviral e estáveis sob o ponto de vista da infecção

pelo HIV, podendo se tornar referência para planejamento de estudos mais amplos e com maior período de observação.

5. CONCLUSÕES

- 1- A presença ou a magnitude da resposta imune à infecção pelo Citomegalovírus, aferidas pela quantificação da produção de interferon γ após estímulo de células CD8+ com antígenos do CMV e pelos níveis de IgG anti-CMV ao longo do tempo, não se associou ao aumento da espessura da íntima e média da artéria carótida (cIMT) em adolescentes infectados pelo HIV, ao longo de dois anos.
- 2- A magnitude da ativação da resposta monocitária, aferida pela quantificação de CD14 solúvel e de células T, aferida pela quantificação de receptor de TNF I solúvel (sTNFR-I) e pela expressão de HLADR+CD38+ ao longo do tempo, não se associou ao aumento da espessura da íntima e média da artéria carótida (cIMT) em adolescentes infectados pelo HIV, ao longo de dois anos.
- 3- A espessura da íntima/média das artérias carótidas da maioria (70%) de adolescentes com coinfeção HIV e CMV situava-se acima do Percentil 75 da distribuição de referencia, sendo que durante o período de 2 anos não ocorreu incremento significativo da espessura da íntima/média dessas artérias.
- 4- A incidência de recorrência da infecção pelo CMV em crianças e adolescentes infectados pelo HIV e em uso de antirretrovirais foi de 0,97/ 100 indivíduos-mês.

6. REFERÊNCIAS

1. (UNAIDS) JUNP on HA. UNAIDS Data 2017 [Internet]. Programme on HIV/AIDS. 2017. Available from: http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/20170720_Data_book_2017_en.pdf
2. UNAIDS. Ending the AIDS epidemic for adolescents, with adolescents. 2016.
3. Ministério da Saúde do Brasil. HIV AIDS 2017. HIV Aids Boletim Epidemiológico. 2017.
4. Walli R, Herfort O, Michl GM, Demant T, Jager H, Dieterle C, et al. Treatment with protease inhibitors associated with peripheral insulin resistance and impaired oral glucose tolerance in HIV-1-infected patients. *AIDS*. 1998;12(15):F167–73.
5. Sims A, Hadigan C. Cardiovascular complications in children with HIV infection. *Curr HIV/AIDS Rep*. 2011 Sep;8(3):209–14.
6. Hunt PW, Lee SA, Siedner MJ. Immunologic biomarkers, morbidity, and mortality in treated HIV infection. *J Infect Dis*. 2016;214(Suppl 2):S44–50.
7. Dillon SM, Frank DN, Wilson CC. The gut microbiome and HIV-1 pathogenesis: a two way street. *AIDS*. 2016;30(18):2737–51.
8. Kelesidis T, Kendall MA, Yang OO, Hodis HN, Currier JS. Biomarkers of microbial translocation and macrophage activation: association with progression of subclinical atherosclerosis in HIV-1 infection. *J Infect Dis*. 2012 Nov 15;206(10):1558–67.
9. Lagathu C, Cossarizza A, Béréziat V, Nasi M, Capeau J, Pinti M. Basic science and pathogenesis of ageing with HIV: potential mechanisms and biomarkers. *Aids*. 2017;31(suppl 2):S105–19.
10. Roeder J, Muenchhoff M, Goulder P. Immune activation and paediatric HIV-1 disease outcome. *Curr Opin HIV AIDS*. 2016;11(2):146–55.
11. Abrams EJ, Weedon J, Steketee RW, Lambert G, Bamji M, Brown T, et al. Association of Human Immunodeficiency Virus (HIV) load early in life with disease progression among HIV-infected infants. *J Infect Dis*. 1998;178(1):101–8.
12. Prendergast A, O’Callaghan M, Menson E, Hamadache D, Walters S, Klein N, et al. Factors influencing T Cell activation and programmed death 1 expression in HIV-infected children. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2012;28(5):465–8.
13. Papasavvas E, Azzoni L, Foulkes A, Violari AVY, Paed FC, Cotton MF, et al. Increased microbial translocation in ≤ 180 days old perinatally Human Immunodeficiency Virus positive infants as compared with Human Immunodeficiency Virus - exposed/uninfected infants of similar age. *Pediatr Infect Dis J*. 2011;30(10):877–82.

14. Pilakka Kanthikeel S, Huang S, Fenton T, Borkowsky W, Cunningham CK, Pahwa S. Increased gut microbia translocation in human immunodeficiency Virus infected children persists in virologic responders and virologic failures following antiretroviral therapy. *Pediatr Infect Dis J*. 2012;31(6):583–91.
15. Abrams EJ, Wiener J, Carter R, Kuhn L, Palumbo P, Nesheim S, et al. Maternal health factors and early pediatric antiretroviral therapy influence the rate of perinatal HIV-1 disease progression in children. *AIDS*. 2003;17(6):867–77.
16. Deayton JR, Sabin CA, Johnson MA, Emery VC, Wilson P, Griffiths PD. Importance of cytomegalovirus viraemia in risk of disease progression and death in HIV-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. *Lancet*. 2004 Jun 26;363(9427):2116–21.
17. Slyker JA, Rowland-Jones SL, Dong T, Reilly M, Richardson B, Emery VC, et al. Acute cytomegalovirus infection is associated with increased frequencies of activated and apoptosis-vulnerable T cells in HIV-1-infected infants. *J Virol*. 2012 Oct;86(20):11373–9.
18. American Academy of Pediatrics. Expert Panel on Integrated Guidelines for Cardiovascular Health and Risk Reduction in Children and Adolescents: Summary Report. *Pediatrics* [Internet]. 2011;128(Supplement 5):S213–56. Available from: <http://pediatrics.aappublications.org/cgi/doi/10.1542/peds.2009-2107C>
19. Verma S, Kuliszewski M a, Li S-H, Szmítko PE, Zucco L, Wang C-H, et al. C-reactive protein attenuates endothelial progenitor cell survival, differentiation, and function : further evidence of a mechanistic link between C-reactive protein and cardiovascular disease. *Circulation*. 2004 May 4;109(17):2058–67.
20. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005 Jul 28;352(4):1685–95.
21. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation*. 2002 Mar 5;105(9):1135–43.
22. Millonig G, Malcom GT, Wick G. Early inflammatory-immunological lesions in juvenile atherosclerosis from the Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY)-study. *Atherosclerosis*. 2002;160(2):441–8.
23. Groner JA, Joshi M, Bauer JA. Pediatric precursors of adult cardiovascular disease: noninvasive assessment of early vascular changes in children and adolescents. *Pediatrics*. 2006 Oct;118(4):1683–91.
24. Slyper AH. Clinical review 168: What vascular ultrasound testing has revealed about pediatric atherogenesis, and a potential clinical role for ultrasound in pediatric risk assessment. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Jul;89(7):3089–95.

25. Chambless LE, Heiss G, Folsom AR, Rosamond W, Szklo M, Sharrett A, et al. Association of coronary heart disease incidence with carotid arterial wall thickness and major risk factors : The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study , 1987-1993. *Am J Epidemiol.* 1997;146(6):483–94.
26. Suh W, Kim KL, Choi J-H, Lee Y-S, Lee J-Y, Kim J-M, et al. C-reactive protein impairs angiogenic functions and decreases the secretion of arteriogenic chemo-cytokines in human endothelial progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Aug 13;321(1):65–71.
27. Verma S. A Self-Fulfilling Prophecy: C-Reactive Protein Attenuates Nitric Oxide Production and Inhibits Angiogenesis. *Circulation* [Internet]. 2002 Jul 29 [cited 2012 Oct 19];106(8):913–9. Available from: <http://circ.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.CIR.0000029802.88087.5>
28. McGill HC, McMahan CA, Gidding SS. Preventing heart disease in the 21st century: Implications of the Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY) study. *Circulation.* 2008;117(9):1216–27.
29. Li S, Chen W, Srinivasan SR, Bond MG, Urbina EM, Berenson GS. Childhood cardiovascular risk factors and carotid vascular changes in adulthood - The Bogalusa Heart Study. *Jama.* 2003;290(17):2271–943.
30. Urbina EM, Williams R V, Alpert BS, Collins RT, Daniels SR, Hayman L, et al. Noninvasive assessment of subclinical atherosclerosis in children and adolescents: recommendations for standard assessment for clinical research: a scientific statement from the American Heart Association. *Hypertension.* 2009 Nov;54(5):919–50.
31. Ishizu T, Ishimitsu T, Yanagi H, Seo Y, Obara K, Moriyama N, et al. Effect of age on carotid arterial intima-media thickness in childhood. *Heart Vessels.* 2004 Jul;19(4):189–95.
32. Sass C, Herbeth B, Chapet O, Siest G, Visvikis S, Zannad F. Intima-media thickness and diameter of carotid and femoral arteries in children, adolescents and adults from the Stanislas cohort: effect of age, sex, anthropometry and blood pressure. *J Hypertens.* 1998 Nov;16(11):1593–602.
33. Jourdan C, Wühl E, Litwin M, Fahr K, Trelewicz J, Jobs K, et al. Normative values for intima-media thickness and distensibility of large arteries in healthy adolescents. *J Hypertens.* 2005 Sep;23(9):1707–15.
34. Doyon A, Kracht D, Bayazit AK, Deveci M, Duzova A, Krmar RT, et al. Carotid artery intima-media thickness and distensibility in children and adolescents: reference values and role of body dimensions. *Hypertension* [Internet]. 2013 Sep [cited 2014 Jan 9];62(3):550–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23817494>
35. Böhm B, Hartmann K, Buck M, Oberhoffer R. Sex differences of carotid intima-media thickness in healthy children and adolescents. *Atherosclerosis* [Internet]. 2009 Oct

[cited 2013 Feb 6];206(2):458–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19389672>

36. Dalla Pozza R, Pirzer R, Beyerlein A, Weberruis H, Oberhoffer R, Schmidt-Trucksass A, et al. Beyond intima-media-thickness: Analysis of the carotid intima-media-roughness in a paediatric population. *Atherosclerosis*. 2016;251:164–9.
37. Engelen L, Ferreira I, Stehouwer CD, Boutouyrie P, Laurent S. Reference intervals for common carotid intima-media thickness measured with echotracking: Relation with risk factors. *Eur Heart J*. 2013;34(30):2368–80.
38. Hsue PY, Deeks SG, Hunt PW. Immunologic basis of cardiovascular disease in HIV-infected adults. *J Infect Dis*. 2012;205(SUPPL. 3):S375–82.
39. Emery S, Neuhaus JA, Phillips AN, Babiker A, Cohen CJ, Gatell JM, et al. Major clinical outcomes in antiretroviral therapy (ART)-naive participants and in those not receiving ART at baseline in the SMART study. *J Infect Dis*. 2008;197(8):1133–44.
40. Baker J V, Peng G, Rapkin J, Abrams D, Silverberg M, MacArthur R, et al. CD4+ count and risk of non-AIDS diseases following initial treatment for HIV infection. *Aids*. 2008;22(7):841–8.
41. Lichtenstein KA, Armon C, Buchacz K, Chmiel JS, Buckner K, Tedaldi EM, et al. Low CD4 + T Cell Count Is a Risk Factor for Cardiovascular Disease Events in the HIV Outpatient Study. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2010;51(4):435–47. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/655144>
42. Guaraldi G, Zona S, Alexopoulos N, Orlando G, Carli F, Ligabue G, et al. Coronary Aging in HIV-Infected Patients. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2009;49(11):1756–62. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/648080>
43. Sandler NG, Wand H, Roque A, Law M, Nason MC, Nixon DE, et al. Plasma levels of soluble CD14 independently predict mortality in HIV infection. *J Infect Dis*. 2011;203(6):780–90.
44. Carr A, Cooper DA. Adverse effects of antiretroviral therapy. *Advers drugs React*. 2000;356(9239):1423–30.
45. Rossum AMC Van, Fraaij PLA, de Groot R. Efficacy of highly active antiretroviral therapy in HIV-1 infected children. *Lancet Infect Dis*. 2002 Feb;2(2):93–102.
46. Arpadi SM, Cuff PA, Horlick M, Wang J, Kotler DP. Lipodystrophy in HIV-infected children is associated with high viral load and low CD4+-lymphocyte count and CD4+-lymphocyte percentage at baseline and use of protease inhibitors and stavudine. *J Acquir Immunodefic Syndr*. 2001;27(1):30–4.
47. Werner MLF, Pone MVDS, Fonseca VM, Chaves CRMDM. Lipodystrophy syndrome and

- cardiovascular risk factors in children and adolescents infected with HIV/AIDS receiving highly active antiretroviral therapy. *J Pediatr (Rio J)*. 2010 Feb 11;86(1):27–32.
48. Charakida M, Donald AE, Green H, Storry C, Clapson M, Caslake M, et al. Early structural and functional changes of the vasculature in HIV-infected children: impact of disease and antiretroviral therapy. *Circulation [Internet]*. 2005 Jul 5 [cited 2012 Jul 17];112(1):103–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15983247>
 49. Ross AC, Storer NR, Ann O’Riordan M, Dogra V, McComsey GA. Longitudinal Changes in Carotid Intima-Media Thickness and Cardiovascular Risk Factors in Human Immunodeficiency Virus-Infected Children and Young Adults Compared With Healthy Controls. *Pediatr Infect Dis J*. 2010;29:634–8.
 50. Miller TL, Somarriba G, Orav EJ, Mendez AJ, Neri D, Schaefer N, et al. Biomarkers of vascular dysfunction in children infected with Human Immunodeficiency Virus-1. *J Acquir Immunodefic Syndr*. 2010;55(2):182–8.
 51. Estripeaut D, Moreno Y, Ruiz SA, Martínez A, Racine JD, Sáez-Llorens X. Seroprevalencia de la infección por citomegalovirus en púerperas y su impacto neonatal. *An Pediatría*. 2007;66(2):135–9.
 52. Yamamoto AY, Mussi-Pinhata MM, Marin LJ, Brito RM, Oliveira PFC, Coelho TB. Is saliva as reliable as urine for detection of cytomegalovirus DNA for neonatal screening of congenital CMV infection? *J Clin Virol*. 2006 Jul;36(3):228–30.
 53. Pass RF. Cytomegalovirus. In: *Fields Virology*. 2001. p. 2675–705.
 54. Hengel H, Brune W, Koszinowski UH. Immune evasion by cytomegalovirus--survival strategies of a highly adapted opportunist. *Trends Microbiol*. 1998 May;6(5):190–7.
 55. Wiertz E, Hill A, Tortorella D, Ploegh H. Cytomegaloviruses use multiple mechanisms to elude the host immune response. *Immunol Lett*. 1997 Jun 1;57(1–3):213–6.
 56. Hendrix MGR, Salimans MMM, van Boven CPA, Bruggeman CA. Rapid Communication High Prevalence of Latently Present Cytomegalovirus in Arterial Walls of Patients Suffering from Grade III Atherosclerosis. *Am J Pathol*. 1990;136(1):23–8.
 57. Melnick L, Dreesman GR, Mccollum CH, Petrie BL, Burek J, Debakey ME. Cytomegalovirus antigen within human arterial smooth muscle cells. *Lancet*. 1983;322(8351):644–7.
 58. Zhou Y, Leon M, Waclawin M, Popma J, Yu ZX, Finkel T, et al. Association between prior cytomegalovirus infection and the risk of restenosis after coronary atherectomy. *N Engl J Med*. 1996;29(9):624–30.
 59. Mcdonald K, Rector T, Braulin E, Kubo S, Olivari M. Association of coronary artery disease in cardiac transplant recipients with cytomegalovirus infection. *Am J Cardiol*.

1989 Oct 15;64:359–62.

60. Nieto FJ, Adam E, Sorlie P, Farzadegan H, Melnick JL, Comstock GW, et al. Coronary Heart Disease/Atherosclerosis/Myocardial Infarction: Cohort Study of Cytomegalovirus Infection as a Risk Factor for Carotid Intimal-Medial Thickening, a Measure of Subclinical Atherosclerosis. *Circulation*. 1996;94(5):922–7.
61. Fabricant CG, Krook L, Gillespie JH. Virus-Induced Cholesterol Crystals. *Science* (80-). 1973;181(4099):566–7.
62. Span AHM, Grauls G, Bosman F, van Boven CPA, Bruggeman CA. Cytomegalovirus infection induces vascular injury in the rat. *Atherosclerosis*. 1992 Mar;93(1–2):41–52.
63. Bruggeman CA. Cytomegalovirus and latency : an overview. *Virchows Arch B Cell Pathol*. 1993;64(6):325–33.
64. Speir E, Modali R, Huang ES, Leon MB, Shawl F, Finkel T, et al. Potential role of human cytomegalovirus and p53 interaction in coronary restenosis. *Science* (80-). 1994;265(5170):391–4.
65. Guetta E, Guetta V, Shibutani T, Epstein SE. Monocytes harboring Cytomegalovirus: interactions with endothelial cells, smooth muscle cells, and oxidized low-density lipoprotein. *Circ Res*. 1997;81(1):8–16.
66. Tanaka K, Zou J-P, Takeda K, Ferrans VJ, Sandford GR, Johnson TM, et al. Effects of human Cytomegalovirus immediate-early proteins on p53-mediated apoptosis in coronary artery smooth muscle cells. *Circulation* [Internet]. 1999 Apr 6 [cited 2012 Sep 6];99(13):1656–9. Available from: <http://circ.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.CIR.99.13.1656>
67. Zhou YF, Yu ZX, Wanishawad C, Shou M, Epstein SE. The immediate early gene products of human cytomegalovirus increase vascular smooth muscle cell migration, proliferation, and expression of PDGF beta-receptor. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 1999 Mar 24;256(3):608–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10080946>
68. Streblov DN, Soderberg-Naucler C, Vieira J, Smith P, Wakabayashi E, Ruchti F, et al. The human cytomegalovirus chemokine receptor US28 mediates vascular smooth muscle cell migration. *Cell* [Internet]. 1999;99(5):511–20. Available from: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=10589679&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers3://publication/uuid/EE826A0F-C61C-4EA7-B18F-94BB1CBFA29F>
69. Tumilowicz JJ, Gawlik ME, Powell BB, Trentin JJ. Replication of Cytomegalovirus in human arterial smooth muscle cells. *J Virol*. 1985;56(3):839–45.
70. Lemström K, Bruning J, Bruggeman C, Lautenschlager I, Häyry P. Cytomegalovirus

- infection enhances smooth muscle cell proliferation and intimal thickening of rat aortic allografts. *J Clin Invest.* 1993;92(2):549–58.
71. Li F, Yin M, Dam V, G J, Gert Grauls, Rozing J, et al. CYTOMEGALOVIRUS INFECTION ENHANCES THE NEOINTIMA FORMATION IN RAT AORTIC ALLOGRAFTS: Effect of Major Histocompatibility Complex Class I and Class II Antigen Differences. 1998;65:1298–304.
 72. Grattan MT, Moreno-Cabral CE, Starnes VA, Oyer PE, Stinson EB, Shumway NE. Cytomegalovirus Infection Is Associated With Cardiac Allograft Rejection and Atherosclerosis. *Jama.* 1989;261:3561–6.
 73. Zhou Y F, B LM, Waclaw M A, J PJ, X YZ, T F, et al. ASSOCIATION BETWEEN PRIOR CYTOMEGALOVIRUS INFECTION AND THE RISK OF RESTENOSIS AFTER CORONARY ATHERECTOMY. *N Engl J Med.* 1996
 74. Boulougoura A, Sereti I. HIV Infection and Immune activation: the role of co-infections. *Curr Opin HIV AIDS.* 2016;11(2):191–200.
 75. Castón JJ, Cantisán S, González-Gasca F, Páez-Vega A, Abdel-Hadi H, Illescas S, et al. Interferon- γ production by CMV-specific CD8+ T lymphocytes provides protection against cytomegalovirus reactivation in critically ill patients. *Intensive Care Med.* 2016;42(1):46–53.
 76. Parry HM, Zuo J, Frumento G, Mirajkar N, Inman C, Edwards E, et al. Cytomegalovirus viral load within blood increases markedly in healthy people over the age of 70 years. *Immun Ageing* [Internet]. 2016;13(1):1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12979-015-0056-6>
 77. Nikitskaya EA, Grivel J, Maryukhnich E V, Lebedeva AM, Ivanova OI, Savvinova P, et al. Cytomegalovirus in Plasma of Acute Coronary Syndrome Patients. *Acta Naturae.* 2016;8(29):102–7.
 78. Nikitskaya E, Lebedeva A, Ivanova O, Maryukhnich E, Shpektor A, Grivel JC, et al. Cytomegalovirus-Productive Infection Is Associated With Acute Coronary Syndrome. *J Am Heart Assoc.* 2016;5(8):1–13.
 79. Smith DM, Nakazawa M, Freeman ML, Anderson CM, Oliveira MF, Little SJ, et al. Asymptomatic CMV Replication During Early Human Immunodeficiency Virus (HIV) Infection Is Associated With Lower CD4/CD8 Ratio During HIV Treatment. *Clin Infect Dis.* 2016;63(11):1517–24.
 80. Aichelburg MC, Weseslindtner L, Mandorfer M, Strassl R, Rieger A, Reiberger T, et al. Association of CMV-specific T cell-mediated immunity with CMV DNAemia and development of CMV disease in HIV-1–infected individuals. *PLoS One* [Internet]. 2015;10(8):e0137096. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0137096>

81. Tembo J, Kabwe M, Chilukutu L, Chilufya M, Mwaanza N, Chabala C, et al. Prevalence and Risk Factors for Betaherpesvirus DNAemia in Children >3 Weeks and <2 Years of Age Admitted to a Large Referral Hospital in Sub-Saharan Africa. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2015;60(3):423–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25352585>
82. Kapetanovic S, Aaron L, Montepiedra G, Anthony P, Thuvamontolrat K, Pahwa S, et al. Effect of Cytomegalovirus co-infection on normalization of selected T-cell subsets in children with perinatally acquired HIV infection treated with combination antiretroviral therapy. *PLoS One* [Internet]. 2015;10(3):e0120474. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4368806&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
83. Weinberg A, Wohl DA, Barrett RJ, van der Horst C. Inconsistent reconstitution of cytomegalovirus-specific cell-mediated immunity in human immunodeficiency virus-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis*. 2001 Sep 15;184(6):707–12.
84. Shinkai M, Bozzette SA, Powderly W, Frame P, Spector SA. Utility of urine and leukocyte cultures and plasma DNA polymerase chain reaction for identification of AIDS patients at risk for developing human cytomegalovirus disease. *J Infect Dis*. 1997 Feb;175(2):302–8.
85. Rasmussen L, Zipeto D, Wolitz RA, Dowling A, Efron B, Merigan TC. Risk for retinitis in patients with AIDS can be assessed by quantitation of threshold levels of cytomegalovirus DNA burden in blood. *J Infect Dis*. 1997 Nov;176(5):1146–55.
86. Gianella S, Letendre S. Cytomegalovirus and HIV: a dangerous pas de Deux. *J Infect Dis*. 2016;214(S2):S67-74.
87. Freeman ML, Lederman MM, Gianella S. Partners in crime: the role of CMV in Immune dysregulation and clinical outcome during HIV infection. *Curr Opin HIV AIDS*. 2016;13(1):10–9.
88. Naeger DM, Martin JN, Sinclair E, Hunt PW, Bangsberg DR, Hecht F, et al. Cytomegalovirus-specific T cells persist at very high levels during long-term antiretroviral treatment of HIV disease. *PLoS One*. 2010 Jan;5(1):e8886.
89. Hunt PW, Martin JN, Sinclair E, Epling L, Teague J, Jacobson MA, et al. Valganciclovir reduces T cell activation in HIV-infected individuals with incomplete CD41 T cell recovery on antiretroviral therapy. *J Infect Dis*. 2011;203(10):1474–83.
90. Effros RB. The silent war of CMV in aging and HIV infection. *Mech Ageing Dev*. 2016;158:46–52.
91. Elkington R, Walker S, Crough T, Menzies M, Tellam J, Bharadwaj M, et al. Ex Vivo profiling of CD8+-T-cell responses to Human Cytomegalovirus reveals broad and

- multispecific reactivities in healthy virus carriers. *J Virol*. 2003;77(9):5226–40.
92. Scholz M, Doerr HW, Cinatl J. Inhibition of cytomegalovirus immediate early gene expression: a therapeutic option? *Antiviral Res*. 2001 Mar;49(3):129–45.
 93. Stone SF, Price P, Khan N, Moss PA, French MA. HIV patients on antiretroviral therapy have high frequencies of CD8 T cells specific for Immediate Early protein-1 of cytomegalovirus. *AIDS*. 2005 Mar 24;19(6):555–62.
 94. Bronke C, Palmer NM, Jansen CA, Westerlaken GHA, Polstra AM, Reiss P, et al. Dynamics of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells in HIV-1-infected individuals progressing to AIDS with CMV end-organ disease. *J Infect Dis*. 2005 Mar 15;191(6):873–80.
 95. Stone SF, Price P, French M a. Cytomegalovirus (CMV)-specific CD8+ T cells in individuals with HIV infection: correlation with protection from CMV disease. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2006 Apr [cited 2013 Jan 8];57(4):585–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16504998>
 96. Weinberg A, Tierney C, Kendall MA, Bosch RJ, Patterson-Bartlett J, Erice A, et al. Cytomegalovirus-specific immunity and protection against viremia and disease in HIV-infected patients in the era of highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis*. 2006 Feb 15;193(4):488–93.
 97. Kempen JH, Jabs DA, Wilson LA, Dunn JP, West SK, Tonascia J. Mortality risk for patients with cytomegalovirus retinitis and acquired Immune Deficiency Syndrome. *Clin Infect Dis*. 2003 Nov 15;37(10):1365–73.
 98. O’Sullivan CE, Drew WL, McMullen DJ, Miner R, Lee JY, Kaslow R a, et al. Decrease of cytomegalovirus replication in human immunodeficiency virus infected-patients after treatment with highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis* [Internet]. 1999 Sep;180(3):847–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10438377>
 99. Jacobson M a, Schrier R, McCune JM, Torriani FJ, Holland GN, O’Donnell JJ, et al. Cytomegalovirus (CMV)-specific CD4+ T lymphocyte immune function in long-term survivors of AIDS-related CMV end-organ disease who are receiving potent antiretroviral therapy. *J Infect Dis*. 2001 May 1;183(9):1399–404.
 100. Slyker J. Cytomegalovirus and paediatric HIV infection. *J virus Erad*. 2016;2:208–14.
 101. Kovacs A, Schluchter M, Easley K, Demmler G, Shearer W, la Russa P, et al. Cytomegalovirus Infection and HIV-1 Disease Progression in Infants Born to HIV-1-Infected Women. *N Engl J Med*. 1999;341(2):77–84.
 102. Deayton J, Mocroft A, Wilson P, Emery VC, Johnson MA, Griffiths PD. Loss of cytomegalovirus (CMV) viraemia following highly active antiretroviral therapy in the absence of specific anti-CMV therapy. *AIDS*. 1999 Jul 9;13(10):1203–6.

103. Bekker V, Bronke C, Scherpbier HJ, Weel JF, Jurriaans S, Wertheim-van Dillen PME, et al. Cytomegalovirus rather than HIV triggers the outgrowth of effector CD8+CD45RA+CD27- T cells in HIV-1-infected children. *AIDS*. 2005 Jul 1;19(10):1025–34.
104. Furman D, Jovic V, Sharma S, Shen-Orr S, Angel C, Onengut-Gumuscu S, et al. Cytomegalovirus infection enhances the immune response to influenza. *Sci Transl Med*. 2015;281(7):281ra43.
105. Brasil M da S. *Recomendações para Terapia Antirretroviral em Crianças e Adolescentes Infectados pelo HIV*. Ministério da Saúde: Brasília, Brasil. 2009. 200 p.
106. Flynn J, Kaelber D, Baker-Smith C, Blowey D, Carrol A, Daniels SR, et al. Clinical Practice Guideline for Screening and Management of High Blood Pressure in Children and Adolescents. *Pediatr Transplant*. 2017;140(3):e20171904.
107. Organization WH. WHO case definitions of HIV for surveillance and revised clinical staging and immunological classification of HIV-related disease in adults and children [Internet]. 2007. Available from: <http://womenchildrenhiv.org>
108. Kuczmarski RJ, Ogden CL, Grummer-strawn LM, Flegal KM, Guo SS, Wei R, et al. CDC Growth Charts: United States. *Advance Data*. 2000.
109. Oliveira AF De, Mattos ÂP, Brasil ALD, Almeida CAN De, Gazal CHA, Leone C, et al. *Avaliação Nutricional da Criança e do Adolescente: Manual de Orientação*. Avaliação nutricional da criança e do adolescente: Manual e orientação. 2009.
110. Freedman D, Serdula M, Srinivasan S, Berenson GS. Relation of circumferences and skinfold thicknesses to lipid and insulin concentrations in children and adolescents: the Bogalusa Heart Study. *Am J Clin Nutr*. 1999;69(2):308–17.
111. Lyra R, Oliveira M, Lins D, Cavalcanti N, Gross JL, Maia FFR, et al. *Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes* [Internet]. Sociedade Brasileira de Diabetes. 2016.
112. Ho HN, Hultin LE, Mitsuyasu RT, Matud JL, Hausner M a, Bockstoce D, et al. Circulating HIV-specific CD8+ cytotoxic T cells express CD38 and HLA-DR antigens. *J Immunol*. 1993 Apr 1;150(7):3070–9.
113. Bohórquez SC, Ortega DN. Estrategias de monitorización inmunológica para la infección por citomegalovirus. *Tratamientos de base inmunológica*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011 Dec;29(Supl 6):28–32.
114. Baldassarre D, Tremoli E, Amato M, Veglia F, Bondioli A, Sirtori CR. Reproducibility Validation Study Comparing Analog and Digital Imaging Technologies for the Measurement of Intima-Media Thickness. *Stroke*. 2000 May 1;31(5):1104–10.
115. Harris P, Taylor R, Thielke R, Payne J, Gonzalez N, Conde J. Research electronic data

- capture (REDCap) – A metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support. *J Biomed Inf.* 2009;42(2):377–81.
116. Cole TJ, Green PJ. Smoothing reference centiles curves: the LMS method and penalized likelihood. *Stat Med.* 1992;11(10):1305–19.
 117. WHO. WHO Case Definition of HIV for Surveillance and Revised Clinical Staging and Immunological Classification of HIV-Related Disease in Adults and Children. 2007;
 118. McGuire W, D'Alessandro U, Stephens S, Olaleye B, Langerock P, Greenwood B, et al. Levels of tumour necrosis factor and soluble TNF receptors during malaria fever episodes in the community. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1998;92(1):50–3.
 119. Blanco A, Solis G, Arranz E, Coto GD, Ramos A, Telleria J. Serum levels of CD14 in neonatal sepsis by Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Acta Paediatr [Internet].* 1996;85(6):728–32.
 120. Bastard JP, Fellahi S, Couffignal C, Raffi F, Gras G, Hardel L, et al. Increased systemic immune activation and inflammatory profile of long-term HIV-infected ART-controlled patients is related to personal factors, but not to markers of HIV infection severity. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70(6):1816–24.
 121. Sarni ROS, Souza FIS de, Battistini TRB, Pitta TS, Fernandes AP, Tardini PC, et al. Lipodystrophy in children and adolescents with acquired immunodeficiency syndrome and its relationship with the antiretroviral therapy employed. *J Pediatr (Rio J) [Internet].* 2009;85(4):329–34.
 122. Steinberger J, Daniels SR. Obesity, insulin resistance, diabetes, and cardiovascular risk in children: An American Heart Association Scientific Statement from the Atherosclerosis, Hypertension, and Obesity in the Young Committee (Council on Cardiovascular Disease in the Young). *Circulation [Internet].* 2003;107(10):1448–53.
 123. Serrano-Villar S, Sainz T, Lee SA, Hunt PW, Sinclair E, Shacklett BL, et al. HIV-infected individuals with Low CD4/CD8 ratio despite effective antiretroviral therapy exhibit altered T cell subsets, heightened CD8+ T cell activation, and increased risk of non-AIDS morbidity and mortality. *PLoS Pathog.* 2014;10(5):e1004078.
 124. Lorenz MW, von Kegler S, Steinmetz H, Markus HS, Sitzer M. Carotid intima-media thickening indicates a higher vascular risk across a wide age range: prospective data from the Carotid Atherosclerosis Progression Study (CAPS). *Stroke.* 2006 Jan;37(1):87–92.
 125. Lorenz MW, Markus HS, Bots ML, Rosvall M, Sitzer M. Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness: a systematic review and meta-analysis. *Circulation.* 2007 Jan 30;115(4):459–67.
 126. Strydom HC, Blankenhorn DH, Chandler a. B, Glagov S, Insull W, Richardson M, et al. A

definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 1992 Jan 1;85(1):391–405.

127. Zannad F, Sass C, Visvikis S. Environmental and genetic determinants of intima-media thickness of the carotid artery. *Clin Exp Pharmacol Physiol* [Internet]. 2001 Dec;28(12):1007–10.
128. Touboul P-J, Hennerici MG, Meairs S, Adams H, Amarenco P, Bornstein N, et al. Mannheim Carotid Intima-Media Thickness Consensus (2004–2006). *Cerebrovasc Dis*. 2007 Jan;23(1):75–80.
129. Dalla Pozza R, Ehringer-Schetitska D, Fritsch P, Jokinen E, Petropoulos A, Oberhoffer R. Intima media thickness measurement in children: A statement from the Association for European Paediatric Cardiology (AEPC) Working Group on Cardiovascular Prevention endorsed by the Association for European Paediatric Cardiology. *Atherosclerosis*. 2015;238(2):380–7.
130. Eckard AR, O’Riordan MA, Storer N, McComsey GA. Long-Term changes in carotid intima-media thickness among HIV-infected children and young adults. *Antivir Ther*. 2014;19(1):61–8.
131. Santos EHS, Dos Santos Neto PJ, Santos IDS. Carotid intima-media thickness in the Brazilian Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-Brasil): a narrative review. *Sao Paulo Med J*. 2018;136(1):64–72.
132. Kalayjian RC, Machekano RN, Rizk N, Robbins GK, Gandhi RT, Rodriguez B a, et al. Pretreatment levels of soluble cellular receptors and interleukin-6 are associated with HIV disease progression in subjects treated with highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis*. 2010 Jun 15;201(12):1796–805.
133. Longenecker C, Funderburg N, Jiang Y, Debanne S, Storer N, Labbato D, et al. Markers of inflammation and CD8 T-cell activation, but not monocyte activation, are associated with subclinical carotid artery disease in HIV-infected individuals. *HIV Med*. 2013 Jan 18;(December 2012):1–6.
134. Ross AC, Rizk N, O’Riordan MA, Dogra V, El-Bejjani D, Storer N, et al. Relationship between inflammatory markers, endothelial activation markers, and carotid intima-media thickness in HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis*. 2009 Oct 1;49(7):1119–27.
135. Merlini E, Luzi K, Suardi E, Barassi A, Cerrone M, Martínez JS, et al. T-cell phenotypes, apoptosis and inflammation in HIV+ patients on virologically effective cART with early atherosclerosis. *PLoS One* [Internet]. 2012 Jan [cited 2013 May 20];7(9):e46073.
136. Walker S, Fazou C, Crough T, Holdsworth R, Kiely P, Veale M, et al. Ex vivo monitoring of human cytomegalovirus-specific CD8+ T-cell responses using QuantiFERON-CMV.

Transpl Infect Dis. 2007 Jun;9(2):165–70.

137. Goulenok T, Boyd A, Larsen M, Fastenackels S, Boccard F, Meynard J-L, et al. Increased carotid intima-media thickness is not associated with T-cell activation nor with cytomegalovirus in HIV-infected never-smoker patients. *AIDS*. 2015;29(3):287–93.

ANEXOS

ANEXO 1. Termo de Consentimento Livre e esclarecido para pais e responsáveis.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PAIS E RESPONSÁVEIS

Título da Pesquisa: Efeitos arteriais da ativação intermitente da infecção pelo Citomegalovírus (CMV) em crianças e adolescentes com infecção vertical pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)

Pesquisadora Principal: *Dra Fernanda Tomé Sturzbecher*, Departamento de Puericultura e Pediatria da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

INTRODUÇÃO

Seu/Sua filho/a está sendo convidado a participar desta pesquisa porque está infectado pelo vírus HIV. Este é o Termo de Consentimento que lhe fornece informações sobre este estudo. A médica responsável por este estudo conversará com você sobre estas informações. Você pode fazer perguntas a qualquer momento. Caso concorde que seu/sua filho/a participe neste estudo, pediremos que assine este termo, do qual você ficará com uma cópia.

POR QUE ESTE ESTUDO ESTÁ SENDO REALIZADO?

A infecção pelo HIV atualmente pode ser adequadamente controlada com o uso das medicações antirretrovirais. Em vista disto, as crianças e adolescentes com a infecção não estão apresentando complicações ou infecções graves como ocorria antigamente. No entanto, estão iniciando a vida adulta com longo tempo de exposição à infecção pelo HIV e às medicações antirretrovirais.

Sabemos que a infecção pelo vírus HIV causa estimulação de inflamação no organismo e que tanto o vírus como os remédios contra o vírus podem causar algumas alterações de alguns elementos do corpo como o colesterol e o açúcar. Por isso, pessoas com infecção pelo HIV têm mais risco de desenvolver aterosclerose (estreitamento dos vasos sanguíneos) do que as pessoas que não possuem a infecção. Essas alterações podem ocasionar Infarto ou Acidente Vascular Cerebral (AVC) futuramente.

A infecção por outro vírus, o Citomegalovírus (CMV), também contribui para o desenvolvimento de aterosclerose. Este vírus causa infecção na maioria das pessoas durante a infância e geralmente não se percebe. Após a primeira infecção, este vírus fica presente em algumas células do organismo de forma permanente sem causar sintomas na pessoa. Ele pode voltar a circular no sangue quando acontece algum estímulo do organismo ou quando a defesa

fica mais baixa, como em pacientes que fazem quimioterapia, transplantes e pacientes com infecção pelo HIV. Nestes casos o Citomegalovírus pode causar pneumonia, infecção das células que produzem o sangue, infecção ocular, inflamação do fígado, do cérebro ou atingir outros órgãos do corpo.

Quando a defesa de pessoas com infecção pelo HIV está muito baixa, podem ocorrer estas complicações pela infecção com o Citomegalovírus, mas mesmo quando a defesa está boa o CMV pode voltar a circular no sangue com maior frequência que nas pessoas sem infecção pelo HIV, mesmo sem causar algum sinal e sintoma aparentes.

Como o Citomegalovírus também pode contribuir para que ocorra o desenvolvimento de aterosclerose, o principal objetivo deste projeto de pesquisa é avaliar se este vírus pode ser um fator importante no aumento do risco de desenvolver a aterosclerose em crianças e adolescentes com infecção pelo HIV.

O QUE MEU FILHO TEM QUE FAZER SE PARTICIPAR NESTE ESTUDO?

Se você concordar que seu filho participe neste estudo, ele será acompanhado ao longo de 2 anos. Neste período ele fará as seguintes avaliações:

- **Avaliação Clínica:** Os dados sobre a evolução do tratamento do seu filho, dados da sua história de tratamento, consultas médicas e as alterações clínicas que ele apresentou serão obtidos nos registros no hospital no início da sua participação no estudo e revisados durante o período de seguimento. A cada 6 meses, o investigador do estudo avaliará seu filho em consulta médica, fará exame físico, medida de pressão arterial, medida da circunferência abdominal e medida de peso e estatura. Esta consulta será programada para o mesmo dia da coleta de exames laboratoriais e durará aproximadamente 1 hora.

- **Exames Laboratoriais:**
 - Avaliação a cada 3 meses:** Além da medida da Carga Viral do HIV e de células CD4 que seu filho habitualmente já realiza na rotina de seguimento clínico no hospital, será feita a coleta de sangue (1ml – 1 colher de chá) para um exame chamado “Antigenemia para o CMV” . Este exame permitirá saber se esse vírus está circulando no sangue de seu filho. Esse exame será feito quando todas as coletas terminarem. Os resultados somente serão comunicados a você se for importante para o cuidado da saúde de seu filho.

 - Avaliação a cada 6 meses:** A cada 6 meses, quando o seu filho vier para colher o sangue que ele normalmente colhe para saber sobre os efeitos da infecção pelo HIV, serão colhidos os exames necessários para a pesquisa, no mesmo dia da consulta médica. Esses exames serão colhidos pelo pessoal da pesquisa. Serão os seguintes esses exames:
- **Exames Bioquímicos** – 2ml (1 colher de chá) –colesterol e triglicérides (gorduras no

sangue); Glicemia (açúcar no sangue); Insulina basal (hormônio do açúcar); **Exames para avaliar inflamação:** 2ml (1 colher de chá) para medir células T CD8 ativadas e Receptor de TNF do tipo I e de molécula CD14 solúvel e - **Exames para avaliar inflamação específica do CMV:** 2ml (1 colher de chá) este exame permitirá que o pesquisador avalie a ativação da imunidade que o Citomegalovírus está promovendo no organismo de seu filho (número de células T CD8 específicas para o CMV ativadas e de anticorpos específicos para o CMV)

Avaliação anual: O exame de **Ultrassonografia** para medida da espessura da parede da artéria carótida (o vaso pulsante que se sente quando se coloca a mão sobre os lados do pescoço) será realizado quando seu filho iniciar a participação no estudo, 1 ano após a primeira avaliação e após 2 anos, ao final do seguimento. Durante esse ultrassom, seu filho terá que permanecer deitado por 10 minutos em repouso antes do exame, será aplicado gel na região do pescoço onde será feito exame e aplicada a peça do aparelho de ultrassom para ver as imagens. O tempo total para realização do exame será de 20 minutos.

OUTRAS INFORMAÇÕES

O pesquisador principal do estudo e o médico ultrassonografista que realizará os exames não irão saber sobre os resultados dos exames laboratoriais do seu filho durante o período que ele estiver em acompanhamento no estudo, para que isto não influencie a sua avaliação durante este período.

Se a medida da presença do CMV no sangue de seu filho mostrar nível alto do vírus, pode ser que os médicos peçam outros exames para pesquisar alterações e para decidir se o seu filho precisa ser tratado. Nesta situação o pesquisador será informado, você e seu filho serão comunicados e todas as medidas necessárias serão providenciadas. Da mesma forma, se a avaliação ultrassonográfica evidenciar outras alterações que indiquem necessidade de intervenção específica você e seu filho serão informados .

POR QUE O MÉDICO TIRARIA MEU FILHO DO ESTUDO ANTES DO FINAL?

Seu filho poderá ser retirado do estudo se: - O estudo for cancelado ou interrompido pelos órgãos reguladores; - Seu filho não conseguir comparecer as visitas do estudo ou não conseguir realizar os procedimentos do estudo; - Se for identificado algum risco para o seu filho relacionado à participação no estudo; - Seu filho necessitar de tratamento para a infecção pelo CMV.

QUAIS SÃO OS RISCOS DO ESTUDO?

Não se espera que ocorram problemas pela participação de seu filho no estudo. Podem ocorrer riscos ou desconforto quando da realização dos exames: Coleta de Sangue: seu filho poderá desmaiar, sentir tontura ou algum desconforto no momento da extração do sangue.

Poderá ocorrer sangramento ou hematoma no local da inserção da agulha. Poderá se formar um coágulo no local de inserção da agulha ou inchaço na pele ao redor. Além disso, há um pequeno risco de infecção no local onde foi extraído o sangue. A pessoa que colherá o sangue é experiente e tomará todo o cuidado para evitar que isso aconteça. Ultrassonografia: este exame não causa dor, mas o seu filho pode sentir incômodo pela aplicação do gel um pouco frio na parte do lado do pescoço, ou se incomodar com a leve pressão da peça do aparelho durante o exame.

HÁ ALGUM BENEFÍCIO EM PARTICIPAR DESTES ESTUDO?

É possível que a participação neste estudo não traga nenhum benefício direto a seu filho, mas as informações obtidas poderão acrescentar conhecimento a respeito dos fatores que contribuem para aumentar o risco de aterosclerose nos pacientes com infecção pelo HIV e assim serem futuramente avaliadas as medidas possíveis para diminuir este risco em outras pessoas.

E QUANTO A CONFIDENCIALIDADE?

Manteremos as informações pessoais do seu filho sob sigilo, usando um código de identificação que não conterá o nome. As publicações deste estudo não usarão o nome de seu filho, nem o identificarão pessoalmente.

Os registros de seu filho podem ser revisados pelo Ministério da Saúde, pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP (HCFMRP-USP) e pela equipe do estudo, respeitadas as regulamentações do Código de Ética do Conselho Federal de Medicina, as resoluções do mesmo órgão sobre auditorias médicas e a legislação brasileira que visam proteger o sujeito da pesquisa.

QUAIS SÃO OS MEUS CUSTOS? RECEBEREI ALGUM PAGAMENTO?

Sua participação neste estudo não resultará em custos adicionais para você. Nem você nem seu filho receberão nenhum tipo de pagamento por participar neste estudo. Você receberá vale-transporte e vale-refeição em quantidade suficiente para permitir que você não gaste nada comparecendo às consultas.

O QUE ACONTECE SE MEU FILHO SOFRER ALGUMA LESÃO?

Se você/seu(sua) filho(a) sofrer algum dano decorrente deste estudo, você/seu(sua) filho(a) receberá imediatamente a assistência adequada. Você deverá se comunicar com a equipe do estudo para ser orientada como buscar tratamento. Você não está renunciando a nenhum de seus direitos legais ao assinar este termo de consentimento.

QUAIS SÃO OS DIREITOS DO MEU FILHO COMO PARTICIPANTE DA PESQUISA?

Participar neste estudo é completamente voluntário. Você poderá decidir que seu filho não participe neste estudo ou que ele se afaste do estudo a qualquer momento. Sua decisão

não terá nenhuma penalidade ou perda de benefícios aos quais ele teria direito e não afetará seu tratamento no HCFMRP-USP.

RECEBEREI NOVAS INFORMAÇÕES?

Você receberá novas informações referentes a este estudo que possam afetar a saúde e bem estar de seu filho.

Em caso de dúvidas ou dificuldades entre em contato com:

Dra Fernanda Tomé Sturzbecher, tel: (16)36022925; (16)36022625

Em caso de dúvidas sobre os seus direitos ou de seu filho como participante de pesquisa entre em contato com:

Dra Márcia Villanova, Coordenadora do CEP do HCFMRP-USP: (16)36022228

Nome do Participante _____

Nome do Responsável Legal Assinatura do Responsável Legal Data

Nome do Pesquisador Assinatura do Pesquisador Data

Nome da testemunha (se necessário) Assinatura da Testemunha Data

ANEXO 2. Termo de Assentimento para participantes.**TERMO DE ASSENTIMENTO**

Título da Pesquisa: Efeitos arteriais da ativação intermitente da infecção pelo Citomegalovírus (CMV) em crianças e adolescentes com infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)

Pesquisadora Principal: *Dra Fernanda Tomé Sturzbecher*, Departamento de Puericultura e Pediatria da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Queremos convidá-lo para participar de um projeto de pesquisa que estamos realizando. Um projeto de pesquisa é uma maneira de obtermos informações sobre algum assunto. Gostaríamos de desenvolver mais conhecimentos sobre os fatores que fazem com que as crianças e adolescentes com infecção pelo HIV tenham mais risco de ter aterosclerose quando adultos do que as crianças e adolescentes sem infecção pelo HIV. A aterosclerose é a inflamação que ocorre nos vasos sanguíneos ao longo dos anos e que pode levar ao estreitamento deles, impedindo a circulação do sangue.

Mais especificamente, nosso principal objetivo é saber se o Citomegalovirus, outro vírus que infecta a maioria das pessoas quando crianças ou jovens, pode favorecer este aumento do risco de desenvolver aterosclerose.

Se concordar em participar do estudo você terá que fazer alguns exames adicionais além dos que você realiza no seu acompanhamento no hospital. Alguns exames de sangue são realizados a cada 3 meses e outros a cada 6 meses e serão coletados no mesmo dia que você já colhe os exames de rotina do hospital. E no momento que entrar no estudo, 1 ano após e depois 2 anos após realizará um ultrassom da região do pescoço para avaliar a artéria carótida, um vaso sanguíneo pulsátil na região do pescoço que pode apresentar alterações que ajudam a identificar o risco de aterosclerose. Neste exame você terá que ficar 10 minutos deitado antes de começar e será aplicado um gel na região do seu pescoço onde será passado o aparelho que fará as imagens da sua artéria. Este exame durará aproximadamente 20 minutos.

Além dos exames, a cada 6 meses você passará por uma consulta médica na qual será verificado o seu peso, altura, medido o tamanho da circunferência da sua cintura e medida a sua pressão arterial.

Riscos do Estudo:

A coleta de sangue pode causar dor e algumas complicações como inchaço no local, hematoma, hemorragia e, às vezes, infecção do local. Além disso, a coleta pode causar desconforto e mal estar. A pessoa que colherá seu exame é experiente e vai tomar os cuidados para evitar que isto aconteça.

Você pode se incomodar também com o ultrassom, pois o gel é um pouco frio e o aparelho que será passado no seu pescoço precisa ser colocado com uma leve pressão. Este exame não vai causar dor.

Benefícios:

Os exames que serão realizados na pesquisa poderão trazer mais informações sobre a sua saúde. No entanto, não sabemos com certeza se o estudo poderá ajudá-lo diretamente. Com o estudo poderemos entender um pouco mais sobre o desenvolvimento da aterosclerose em pacientes com infecção pelo HIV e assim avaliar medidas que podem ajudar outras crianças e adolescentes no futuro.

Você não é obrigado a participar no estudo. A decisão é sua. Você pode concordar agora e mudar de ideia depois, basta nos avisar. Ninguém ficará chateado ou bravo se você mudar de ideia e você continuará a receber o mesmo atendimento médico que recebia antes. Se você quiser, procure Dra. Fernanda Tomé Sturzbecher no telefone 36022925.

Antes de você concordar em participar do estudo, nós responderemos todas as perguntas que você queira fazer. Se você desejar participar do estudo, assine abaixo. Você receberá uma cópia deste documento para guardar com você.

Nome do Participante _____

_____ / / _____
Assinatura do Participante Data

Nome do Pesquisador _____

_____ / / _____
Assinatura do Pesquisador Data

Nome do Responsável Legal _____

_____ / / _____
Assinatura do Responsável Data

Nome da Testemunha (se necessário) _____

_____ / / _____
Assinatura da Testemunha Data

ANEXO 3. Detalhamento de dados do seguimento clínico dos participantes da pesquisa.**Tabela 23.** Detalhamento das alterações de perfil lipídico identificadas durante o seguimento no estudo

| Colesterol Total | Acima de 170mg/dl | Abaixo de 170mg/dl | Total |
|-------------------------|------------------------------|-------------------------------|--------------|
| Entrada | 13 (33.33) | 26 (66.67) | 39 |
| 0 - 12 meses | 15 (37.50) | 25 (62.50) | 40 |
| 12 - 24 meses | 13 (32.50) | 27 (67.50) | 40 |
| Triglicérides | Acima de 100mg/dl | Abaixo de 100mg/dl | Total |
| Entrada | 18 (53.85) | 21 (46.15) | 39 |
| 0 - 12 meses | 18 (45.00) | 22 (55.00) | 40 |
| 12 - 24 meses | 18 (45.00) | 22 (55.00) | 40 |
| LDL - colesterol | Acima de 110mg/dl | Abaixo de 110mg/dl | Total |
| Entrada | 9 (25.00) | 27 (75.00) | 36 |
| 0 - 12 meses | 13 (32.50) | 27 (67.50) | 40 |
| 12 - 24 meses | 6 (15.00) | 34 (85.00) | 40 |
| HDL - colesterol | Abaixo de 45mg/dl | Acima de 45mg/dl | Total |
| Entrada | 20 (54.05) | 17 (45.95) | 37 |
| 0 - 12 meses | 29 (72.50) | 11 (27.50) | 40 |
| 12 - 24 meses | 25(62.50) | 15 (37.50) | 40 |

Tabela 24. Características clínicas do indivíduo que apresentou placa aterosclerótica na avaliação ultrassonográfica no exame de 24 meses.

| CARACTERÍSTICA | INDIVÍDUO |
|--|--|
| Forma de aquisição da infecção pelo vírus HIV: | Vertical |
| Idade na entrada: | 15 anos |
| Sexo: | Masculino |
| Classificação OMS na visita inicial (Clínica/Imunológica): | Assintomático/ None |
| Classificação CDC: | C3 |
| Doença pelo CMV prévia: | Não |
| Terapia Antiretroviral em uso: | Zidovudina + Lamivudina + Lopinavir/ Ritonavir |
| Média da contagem de células CD4 (min. – max.): | 917 (591 – 1190) |
| Log da Quantificação da Carga Viral do HIV | <40 em todo o período |
| Historia familiar de risco cardiovascular | Positiva |
| Evolução do perfil lipídico (mg/dl) | Colesterol total: 237,17 (212,83 – 266,00) Triglicerídeos: 196,76 (141,00 – 263,00) |
| Media (min – max) | LDL – colesterol: 152,80 (128,00 – 165,00) HDL – colesterol: 45,09 (38,67 – 53,00) |
| Hemoglobina glicosilada (%)/ HOMA-IR | 4,90/ 0,79 |
| Marcadores inflamatórios | HLADR+CD38+ (%): 11,40 (3,10 – 17,70) sTNFR1: (ng/ml) 1,19 (0,69 – 2,42) |
| Media (min – max) | sCD14 (ng/ml): 2.955,43 (2.330,47 – 3.430,12) |
| Quantiferon CMV: | Reativo |
| Média de interferon Quantiferon CMV (UI/ml): | 1,25 |
| cIMT (mm) | D: 0,41 – 0,34 – 0,32 E: 0,46 – 0,32 – 0,37 |

*Os níveis de glicemia e as aferições de pressão arterial estavam dentro da normalidade em todas as avaliações deste participante.

Tabela 25. Níveis séricos de anticorpos IgG para CMV (UI/ml) para cada um dos participantes em cada uma das visitas do estudo.

| Identificação | Entrada | 6 meses | 12 meses | 18 meses | 24 meses |
|----------------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 1 | 79,50 | 78,40 | 111,00 | | 74,20 |
| 2 | 93,20 | 122,00 | 119,00 | 111,00 | 107,00 |
| 3 | 44,50 | 56,60 | 53,10 | 49,60 | 53,00 |
| 4 | 106,00 | 126,00 | 118,00 | 125,00 | 151,00 |
| 5 | 45,20 | 70,90 | 73,60 | 56,20 | 54,80 |
| 7 | 111,00 | 143,00 | 148,00 | 98,00 | 140,00 |
| 8 | 69,80 | 103,00 | 106,00 | 80,00 | 76,20 |
| 10 | 141,00 | 545,00 | 165,00 | 126,00 | 126,00 |
| 11 | 112,00 | 141,00 | 139,00 | 92,50 | 101,00 |
| 13 | 60,20 | 81,20 | 80,60 | 68,90 | 72,40 |
| 14 | 106,00 | 73,20 | 118,00 | 82,00 | 84,80 |
| 15 | 147,00 | 156,00 | 123,00 | | 142,00 |
| 17 | 166,00 | 177,00 | 157,00 | 123,00 | 135,00 |
| 18 | 35,90 | 32,90 | 43,40 | 40,00 | 39,10 |
| 20 | 74,30 | 82,00 | 109,00 | | 88,10 |
| 21 | 59,30 | 65,00 | 74,70 | 65,40 | 76,80 |
| 22 | 172,00 | 823,00 | 830,00 | 146,00 | 156,00 |
| 23 | 67,10 | 81,00 | 84,90 | 78,00 | 82,60 |
| 24 | 511,00 | 172,00 | 680,00 | 145,00 | 154,00 |
| 25 | 921,00 | 914,00 | 951,00 | 144,00 | 173,00 |
| 26 | 629,00 | 562,00 | 169,00 | 155,00 | 151,00 |
| 27 | 122,00 | 112,00 | 178,00 | 118,00 | 108,00 |
| 28 | 830,00 | 961,00 | 1420,00 | 180,00 | 162,00 |
| 29 | 152,00 | 109,00 | 151,00 | 128,00 | 138,00 |
| 30 | 150,00 | 107,00 | 1020,00 | 148,00 | 150,00 |
| 31 | 85,80 | 83,40 | | 68,10 | 72,30 |
| 32 | 134,00 | 142,00 | | 114,00 | 119,00 |
| 33 | 14,09 | 14,00 | 14,00 | 15,00 | 24,60 |
| 35 | 76,40 | 90,80 | 56,80 | 87,40 | 73,60 |
| 36 | 90,40 | 98,30 | 73,00 | 95,00 | 92,50 |
| 37 | 157,00 | 150,00 | 111,00 | 124,00 | 118,00 |
| 38 | 108,00 | 99,30 | 78,00 | 96,30 | 98,80 |
| 39 | 88,10 | 89,60 | 61,30 | 73,60 | 66,10 |
| 40 | 107,00 | 97,70 | 85,20 | 84,60 | 12,50 |
| 41 | 115,00 | 117,00 | 102,15 | 109,00 | 112,00 |
| 42 | 638,00 | 578,00 | 151,00 | 157,00 | 122,00 |
| 43 | 173,00 | 169,00 | 118,00 | 133,00 | 113,00 |
| 45 | 82,60 | 80,60 | 57,90 | 81,20 | 89,50 |
| 47 | 153,00 | 157,00 | 129,00 | 139,00 | 180,00 |
| 48 | 85,50 | 79,10 | 69,70 | 67,30 | 84,50 |

ANEXO 4. Instrumentos de coleta de dados utilizando REDCap

Confidential

Efeitos arteriais da ativação intermitente da infecção pelo CMV em crianças e adolescentes com infecção pelo HIV
Page 1 of 19

Dados Gerais

| | |
|---------------------|--|
| Record ID | _____ |
| Nome do paciente | _____ |
| Nome do responsável | _____ |
| Endereço | _____ |
| Telefone | _____ |
| Data de Nascimento | _____ |
| Data da Entrada | _____ |
| (DD/MM/AAAA) | _____ |
| Idade na Entrada | _____ |
| Sexo | <input type="radio"/> masculino <input type="radio"/> feminino |

Confidential

Efeitos arteriais da ativação intermitente da infecção pelo CMV em crianças e adolescentes com infecção pelo HIV
Page 2 of 19**Historia Clinica**

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|---|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Classificação CDC | A1 | A2 | A3 | B1 | B2 | B3 | C1 | C2 | C3 | N1 | N2 | N3 | | | | | | |
| | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | | | | | | |
| Idade (anos) na Classificação | < 1 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 |
| | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> | <input type="radio"/> |
| Classificação OMS | Assintomático | | | Estágio Clínico 1 | | | Estágio Clínico 2 | | | Estágio Clínico 3 | | | Estágio Clínico 4 | | | | | |
| | <input type="radio"/> | | | <input type="radio"/> | | | <input type="radio"/> | | | <input type="radio"/> | | | <input type="radio"/> | | | | | |
| Classificação Imunológica OMS | <input type="radio"/> None/ Not significant <input type="radio"/> Mild <input type="radio"/> Advanced <input type="radio"/> Severe | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Mínimo CD4 absoluto | _____ | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | (Menor CD4 absoluto antes do estudo) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Data menor CD4 absoluto | _____ | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Idade menor CD4 absoluto | _____ | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Menor % CD4 | _____ | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | (Menor % de CD4 antes do estudo) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Data menor % CD4 | _____ | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | (Data da menor % CD4) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Idade menor %CD4 | _____ | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | (Idade na menor % de CD4) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Doença pelo CMV prévia | <input type="radio"/> Yes <input type="radio"/> No | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Tipo de doença pelo CMV | <input type="checkbox"/> Ocular <input type="checkbox"/> Pneumonite <input type="checkbox"/> Colite <input type="checkbox"/> SNC <input type="checkbox"/> Sistema Linfematopoiético <input type="checkbox"/> Congênito confirmado sintomático <input type="checkbox"/> Congênito confirmado assintomático <input type="checkbox"/> Congênito suspeito sintomático <input type="checkbox"/> Outros (não Congênito) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Outros | _____ | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | (Especifique) | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Confidential

Page 3 of 19

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------------------------|--|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Idade (anos) na Doença pelo CMV | <input type="radio"/> < 1 | <input type="radio"/> 1 | <input type="radio"/> 2 | <input type="radio"/> 3 | <input type="radio"/> 4 | <input type="radio"/> 5 | <input type="radio"/> 6 | <input type="radio"/> 7 | <input type="radio"/> 8 | <input type="radio"/> 9 | <input type="radio"/> 10 | <input type="radio"/> 11 | <input type="radio"/> 12 | <input type="radio"/> 13 | <input type="radio"/> 14 | <input type="radio"/> 15 | <input type="radio"/> 16 | <input type="radio"/> 17 |
| Uso de Ganciclovir terapêutico prévio | <input type="radio"/> Yes <input type="radio"/> No (Uso prévio de Ganciclovir) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Tempo de uso | (Uso do Ganciclovir Terapêutico em semanas completas) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Uso de Ganciclovir profilático prévio | <input type="radio"/> Yes <input type="radio"/> No (Uso prévio profilático) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Tempo de uso profilático | (Tempo de uso de Ganciclovir profilático em semanas completas) | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Risco cardiovascular familiar | <input type="radio"/> Sim <input type="radio"/> Não <input type="radio"/> Desconhecido | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Histórico de ARV

Inibidores da TR análogos nucleosídeos/
nucleotídeos

- Zidovudina
 Lamivudina
 Estavudina
 Didanosina
 Abacavir
 Tenofovir
 Nunca usou

Tempo de uso Zidovudina

_____ (meses completos)

Tempo de uso Lamivudina

_____ (meses completos)

Tempo de uso Estavudina

_____ (meses completos)

Tempo de uso Didanosina

_____ (meses completos)

Tempo de uso Abacavir

_____ (meses completos)

Tempo de uso Tenofovir

_____ (meses completos)

Inibidores da TR não análogos

- Nevirapina
 Efavirenz
 Etravirina
 Nunca usou

Tempo de uso Nevirapina

_____ (meses completos)

Tempo de uso Efavirenz

_____ (meses completos)

Tempo de uso Etravirina

_____ (meses completos)

Confidential

Page 5 of 19

| | |
|-----------------------------------|--|
| Inibidores de Protease | <input type="checkbox"/> Lopinavir/Ritonavir <input type="checkbox"/> Nelfinavir <input type="checkbox"/> Atazanavir <input type="checkbox"/> Fosamprenavir <input type="checkbox"/> Indinavir <input type="checkbox"/> Ritonavir <input type="checkbox"/> Ritonavir (booster) <input type="checkbox"/> Darunavir <input type="checkbox"/> Amprenavir <input type="checkbox"/> Nunca usou |
| Tempo de uso Lopinavir/ Ritonavir | _____ (meses completos) |
| Tempo de uso Nelfinavir | _____ (meses completos) |
| Tempo de uso Atazanavir | _____ (meses completos) |
| Tempo de uso Fosamprenavir | _____ (meses completos) |
| Tempo de uso Indinavir | _____ (meses completos) |
| Tempo de uso Ritonavir | _____ (meses completos) |
| Tempo de uso Ritonavir (booster) | _____ (meses completos) |
| Tempo de uso Darunavir | _____ (meses completos) |
| Enfuvirtida | <input type="radio"/> Yes <input type="radio"/> No |
| Tempo de uso de Enfuvirtida | _____ (meses completos) |
| Raltegravir | <input type="radio"/> Yes <input type="radio"/> No |
| Tempo de uso do Raltegravir | _____ (meses completos) |

Confidential

Page 6 of 19

| | |
|------------------------------|--|
| Maraviroc | <input type="radio"/> Yes <input type="radio"/> No |
| Tempo de uso de Maraviroc | _____ |
| | (meses completos) |
| Esquema Antiretroviral atual | <input type="checkbox"/> ITRN <input type="checkbox"/> ITRNN <input type="checkbox"/> IP <input type="checkbox"/> Enfuvirtida <input type="checkbox"/> Raltegravir <input type="checkbox"/> Maraviroc <input type="checkbox"/> Não faz uso |
| ITRN atual | <input type="checkbox"/> Zidovudina <input type="checkbox"/> Lamivudina <input type="checkbox"/> Estavudina <input type="checkbox"/> Didanosina <input type="checkbox"/> Abacavir <input type="checkbox"/> Tenofovir |
| ITRNN atual | <input type="checkbox"/> Nevirapina <input type="checkbox"/> Efavirenz <input type="checkbox"/> Etravirina |
| IP atual | <input type="checkbox"/> Lopinavir/ Ritonavir <input type="checkbox"/> Atazanavir <input type="checkbox"/> Ritonavir <input type="checkbox"/> Ritonavir (booster) <input type="checkbox"/> Fosamprenavir <input type="checkbox"/> Indinavir <input type="checkbox"/> Darunavir |

Confidential

Efeitos arteriais da ativação intermitente da infecção pelo CMV em crianças e adolescentes com infecção pelo HIV
Page 9 of 19**Rotina em todas as visitas**

| | |
|-------------------------------------|---|
| Visita realizada? | <input type="radio"/> Yes <input type="radio"/> No |
| Data da visita | _____ |
| Visita | <input type="radio"/> Entrada <input type="radio"/> 3 meses <input type="radio"/> 6 meses <input type="radio"/> 9 meses <input type="radio"/> 12 meses <input type="radio"/> 15 meses <input type="radio"/> 18 meses <input type="radio"/> 21 meses <input type="radio"/> 24 meses <input type="radio"/> interrupção precoce |
| Células CD4 | _____ (mm ³) |
| Número de Células CD4 | <input type="radio"/> < 200 <input type="radio"/> 200 - 500 <input type="radio"/> >500 <input type="radio"/> não obtido |
| % Células CD4 | _____ (%) |
| Classificação % Células CD4 | <input type="radio"/> < 15 <input type="radio"/> 15 - 25 <input type="radio"/> >25 <input type="radio"/> não obtido |
| Relação Células CD4/CD8 | _____ |
| Classificação Relação CD4/CD8 | <input type="radio"/> < 1 <input type="radio"/> > 1 <input type="radio"/> não obtido |
| Quantificação da Carga Viral do HIV | _____ (PCR RNA Roche - cópias/ml (00 se < 40)) |
| Log Carga Viral do HIV | _____ (00 se indetectável) |
| Vacinação desde a última visita | _____ |

| | |
|-------------------------------|---|
| Vacinação nos últimos 30 dias | <input type="radio"/> Yes <input type="radio"/> No |
|-------------------------------|---|

| | |
|---|--|
| Intercorrências infecciosas nos últimos 3 meses | <input type="checkbox"/> Infecção bacteriana <input type="checkbox"/> Infecção viral <input type="checkbox"/> Infecção fúngica <input type="checkbox"/> Não se aplica (Entrada) <input type="checkbox"/> Outros <input type="checkbox"/> Não apresentou <input type="checkbox"/> Sem informação (Assinalar todos os que se aplicam) |
|---|--|

| | |
|--------------------|-------|
| Descrição "Outros" | _____ |
|--------------------|-------|

| | |
|----------------------------------|-------|
| Descrição infecção (Dx, período) | _____ |
|----------------------------------|-------|

| | |
|--|---|
| Intercorrências infecciosas sistêmicas nos últimos 30 dias | <input type="radio"/> Yes <input type="radio"/> No |
|--|---|

| | |
|---|---|
| Intercorrências infecciosas localizadas nos últimos 30 dias | <input type="radio"/> Yes <input type="radio"/> No |
|---|---|

*Confidential*Efeitos arteriais da ativação intermitente de infecção pelo CMV em crianças e adolescentes com infecção pelo HIV
Page 7 of 19**PCR para CMV sérico**

PCR CMV

-
- Yes
-
-
- No

Data da coleta

PCR qualitativo

-
- positivo
-
-
- negativo
-
-
- não realizado

PCR Quantitativo

(cópias/ml)

*Confidential*Efeitos arteriais da ativação intermitente da infecção pelo CMV em crianças e adolescentes com infecção pelo HIV
Page 8 of 19**Antigenemia para CMV**

| | |
|-----------------------|---|
| Antigenemia para CMV | <input type="radio"/> Yes <input type="radio"/> No |
| Data da antigenemia | _____ |
| Resultado Antigenemia | _____ |
| Antigenemia | <input type="radio"/> positivo <input type="radio"/> negativo <input type="radio"/> não se aplica |
| Neutrófilos absoluto | _____ (x1000) |

Visitas de follow up

| | |
|----------------------------|--|
| Visita realizada? | <input type="radio"/> Yes <input type="radio"/> No (Se não, preencher form Interrupção Precoce) |
| Data da Visita | _____ |
| Sexo | <input type="radio"/> Feminino <input type="radio"/> Masculino |
| Estadiamento Puberal (M) | <input type="radio"/> M1 <input type="radio"/> M2 <input type="radio"/> M3 <input type="radio"/> M4 <input type="radio"/> M5 |
| Estadiamento Puberal (G) | <input type="radio"/> G1 <input type="radio"/> G2 <input type="radio"/> G3 <input type="radio"/> G4 <input type="radio"/> G5 |
| Estadiamento Puberal (P) | <input type="radio"/> P1 <input type="radio"/> P2 <input type="radio"/> P3 <input type="radio"/> P4 <input type="radio"/> P5 |
| Peso | _____ (kg) |
| Estatura | _____ (cm) |
| Percentil de Estatura NCHS | <input type="radio"/> p5 <input type="radio"/> p10 <input type="radio"/> p25 <input type="radio"/> p50 <input type="radio"/> p75 <input type="radio"/> p90 <input type="radio"/> p95 |
| IMC | _____ (kg/m ²) |
| Classificação IMC | <input type="radio"/> p10 e < ou = p85 <input type="radio"/> >p85 até p99 <input type="radio"/> > ou = p99 <input type="radio"/> não obtido |

| | |
|--------------------------------------|---|
| Pressão Arterial Sistólica | <input type="text"/> |
| | (mmHg) |
| Pressão Arterial Diastólica | <input type="text"/> |
| | (mmHg) |
| Pressão Arterial (percentil) | <input type="radio"/> < p90 <input type="radio"/> > ou = p90 até p95 <input type="radio"/> > ou = p95 <input type="radio"/> PS 85 - acima de 18 anos <input type="radio"/> não obtido |
| Circunferência Abdominal | <input type="text"/> |
| | (cm) |
| Circunferência Abdominal (percentil) | <input type="radio"/> < p90 <input type="radio"/> > ou = p90 <input type="radio"/> > ou = 102cm em homens > 18 a <input type="radio"/> > ou = 88cm em mulheres > 18a <input type="radio"/> < limite em > 18a <input type="radio"/> não obtido |
| Colesterol Total | <input type="text"/> |
| | (mg/dl) |
| Classificação Colesterol Total | <input type="radio"/> < 150 <input type="radio"/> > ou = 150 até 170 <input type="radio"/> > ou = 170 <input type="radio"/> não obtido |
| Triglicérides | <input type="text"/> |
| | (mg/dl) |
| Classificação Triglicérides | <input type="radio"/> < 100 <input type="radio"/> > ou = 100 até 130 <input type="radio"/> > ou = 130 <input type="radio"/> < 150 - acima de 18 anos <input type="radio"/> > ou = 150 - acima de 18 anos <input type="radio"/> não obtido |
| HDL Colesterol | <input type="text"/> |
| | (mg/dl) |
| Classificação HDL Colesterol | <input type="radio"/> < 45 <input type="radio"/> > ou = 45 <input type="radio"/> < 40; masculino - acima de 18 anos <input type="radio"/> > ou = 40; masculino - acima de 18 anos <input type="radio"/> < 50; feminino - acima de 18 anos <input type="radio"/> > ou = 50; feminino - acima de 18 anos <input type="radio"/> não obtido |

| | |
|------------------------------|--|
| LDL Colesterol | <input type="text" value="(mg/dl)"/> |
| Classificação LDL Colesterol | <input type="radio"/> < 100 <input type="radio"/> > ou = 100 até 130 <input type="radio"/> > ou = 130 <input type="radio"/> não obtido |
| Glicemia de jejum | <input type="text" value="(mg/dl)"/> |
| Classificação glicemia | <input type="radio"/> < 100 <input type="radio"/> > ou = 100 e < 126 <input type="radio"/> > ou = 126 <input type="radio"/> < 110 - acima de 18 anos <input type="radio"/> > ou = 110 - acima de 18 anos <input type="radio"/> não obtido |
| Glicemia (estadiamento) | <input type="radio"/> < ou = p90 <input type="radio"/> > p90 <input type="radio"/> não obtido <input type="radio"/> N/A |
| Insulinemia | <input type="radio"/> Yes <input type="radio"/> No |
| Insulina basal | <input type="text" value="((00 se não realizada))"/> |
| Insulina (estadiamento) | <input type="radio"/> < ou = p90 <input type="radio"/> > p90 <input type="radio"/> não se aplica |
| HOMA IR | <input type="radio"/> Yes <input type="radio"/> No |
| Valor HOMA IR | <input type="text"/> |
| Classificação HOMA IR | <input type="radio"/> < 2,5 <input type="radio"/> 2,5 a 3,0 <input type="radio"/> > ou = a 3,0 <input type="radio"/> não se aplica <input type="radio"/> não obtido |
| Hemoglobina glicada | <input type="radio"/> Yes <input type="radio"/> No |
| Valor Hb glicada | <input style="width: 100px;" type="text" value="(%)"/> |

| | |
|---------------------------------------|---|
| Classificação Hb glicada | <input type="radio"/> < 5,7% <input type="radio"/> 5,7 - 6,4% <input type="radio"/> > ou = 6,5% <input type="radio"/> não se aplica <input type="radio"/> não obtido |
| Clearance de Creatinina | <input type="radio"/> Yes <input type="radio"/> No |
| Classificação Clearance de Creatinina | <input type="radio"/> > ou = 90 <input type="radio"/> 60 - 90 <input type="radio"/> < 60 <input type="radio"/> não se aplica <input type="radio"/> não obtido (ml/min/1,73m ²) |
| CMV IgM | _____ |
| CMV IgG | _____ |
| Técnica Sorologia para CMV | <input type="radio"/> VIDAS <input type="radio"/> Imunoenzimático <input type="radio"/> Outro |
| Quantiferon CMV | _____ |
| | (Nil, CMV Antigen e Mitogen) |
| Interpretação Quantiferon CMV | <input type="radio"/> Reativo <input type="radio"/> Não reativo <input type="radio"/> Indeterminado |
| sTNFR | _____ |
| sCD14 | _____ |
| TCDB+HLADR+CD38+ | _____ |

Confidential

Efeitos arteriais da ativação intermitente da infecção pelo CMV em crianças e adolescentes com infecção pelo HIV
Page 11 of 29**Avaliação cIMT**

| | |
|--|---|
| Avaliação US | <input type="radio"/> Yes <input type="radio"/> No |
| Data da Avaliação | _____ |
| Artéria Carótida Comum Direita 1 | _____ {mm} |
| Artéria Carótida Comum Direita 2 | _____ {mm} |
| Artéria Carótida Comum Direita 3 | _____ {mm} |
| Artéria Carótida Comum Direita - média | _____ {mm} |
| Bulbo Direito 1 | _____ {mm} |
| Bulbo Direito 2 | _____ {mm} |
| Bulbo Direito 3 | _____ {mm} |
| Bulbo direito - média | _____ {mm} |
| Artéria Carótida Comum Esquerda 1 | _____ {mm} |
| Artéria Carótida Comum Esquerda 2 | _____ {mm} |
| Artéria Carótida Comum Esquerda 3 | _____ {mm} |
| Artéria Carótida comum E - média | _____ {mm} |

Confidential

Page 12 of 19

Bulbo Esquerdo 1

 (mm)

Bulbo Esquerdo 2

 (mm)

Bulbo Esquerdo 3

 (mm)

Bulbo E - média

 (mm)

Confidential

Efeitos arteriais da ativação intermitente da infecção pelo CMV em crianças e adolescentes com infecção pelo HIV
Page 17 of 19**Mudança ARV**

Mudança de ARV?

- Yes
 No

Data da mudança

Tempo da mudança antes da visita

Antiretrovirais do novo esquema

- ITRN
 ITRNN
 IP
 Enfuvirtida
 Raltegravir
 Maraviroc

ITRN

- Zidovudina
 Lamivudina
 Estavudina
 Didanosina
 Abacavir
 Tenofovir

ITRNN

- Nevirapina
 Efavirenz
 Etravirina

IP

- Lopinavir/ Ritonavir
 Atazanavir
 Ritonavir
 Ritonavir (booster)
 Darunavir
 Fosamprenavir
 Indinavir

Confidential

Efeitos arteriais da ativação intermitente da infecção pelo CMV em crianças e adolescentes com infecção pelo HIV
Page 18 of 19**Classificação CDC/ OMS**

Mudança da classificação

- Yes
 No

Classificação CDC final

- N1
 N2
 N3
 A1
 A2
 A3
 B1
 B2
 B3
 C1
 C2
 C3
 N/A

Classificação OMS final

- Assintomático
 Estágio Clínico 1
 Estágio Clínico 2
 Estágio Clínico 3
 Estágio Clínico 4
 N/A

Confidential

Efeitos arteriais da ativação intermitente de infecção pelo CMV em crianças e adolescentes com infecção pelo HIV
Page 19 of 19**Interrupção precoce**

Interrupção Precoce

- Yes
 No

Motivo da Interrupção

- Retirada do TCLE
 Condição clínica que impede a continuação no estudo
 Perda do contato com o sujeito
 Impossibilidade do sujeito de realizar as avaliações do estudo
 Interrupção do estudo pelo pesquisador
 Doença pelo CMV
 Outro motivo

Outro motivo