

Beatriz da Costa Thomé

Senescência e exaustão de células T e resposta vacinal em crianças infectadas perinatalmente pelo HIV

Versão Corrigida

(Versão original encontra-se na unidade que aloja
o Programa de Pós-graduação)

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

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientador: Prof. Dr. Esper Georges Kallás

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Thomé, Beatriz da Costa
Senescência e exaustão de células T e resposta
vacinal em crianças infectadas perinatalmente pelo
HIV / Beatriz da Costa Thomé. -- São Paulo, 2019.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.
Orientador: Esper Georges Kallás.

Descritores: 1.HIV 2.Transmissão vertical de
doença infecciosa 3.Senescência celular 4.Ativação
celular 5.Resposta vacinal 6.Terapia
antirretroviral de alta atividade

USP/FM/DBD-152/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

Aos meus pais, pelo apoio e amor incondicionais.

Às crianças vivendo com HIV, com meu mais profundo respeito.

Agradecimientos

Aos pacientes e seus responsáveis, por terem generosamente participado deste estudo.

Ao Prof. Dr. Esper Georges Kallás, meu orientador, pela oportunidade inestimável deste mergulho na ciência. Por seu exemplo de pesquisador de excelência e disseminador de conhecimento. Pelo convívio leve, divertido e inspirador.

À Prof. Dra. Elaine Abrams, pela mentoria e amizade através do tempo e espaço. Pela contribuição na concepção e interpretação deste trabalho e anterior à ele.

Aos médicos assistentes dos pacientes incluídos neste estudo, em particular às Prof. Dra. Marinella Della Negra e Dra. Denise Peluso, do Instituto de Infectologia Emílio Ribas (IIER), e às Prof. Dra. Heloisa Marques e Dra. Giuliana Durigon, do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (ICR-HCFMUSP). Ao Gerson e à Neusa, pelas coletas de sangue.

Ao amigo João Miraglia, pela análise estatística e pelas discussões produtivas ao longo deste projeto.

À equipe do LIM-60: Helena Tomiyama, Vinicius Vieira, Lucas Jacintho, Lucas Umesaki Itto, pelo trabalho com as amostras e pelas análises de citometria de fluxo. Em particular a Priscilla Costa, pela profunda contribuição para a concepção das análises e para a interpretação dos resultados.

Aos membros da minha banca de qualificação, pelas ricas contribuições para a continuação deste trabalho.

A Maria Candida Dantas, Zelinda Nakagawa, Roseli Santo e Eleni Arruda pelo apoio administrativo e moral. A Natalia Cerqueira pela ajuda com o REDCap.

Aos meus colegas de trabalho na UNIFESP e no Instituto Butantan pela compreensão e apoio. À minha irmã Marina pela companhia.

Ao meu parceiro de vida, Felipe, e aos meus filhos Nuno e Caetano, pela sólida base de amor que permitiu esse vôo.

Normatização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento de sua publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L.Freddi, Maria F.Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviatura dos títulos e periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

	Lista de abreviaturas e siglas.....	
	Lista de símbolos.....	
	Lista de figuras.....	
	Lista de tabelas.....	
	Resumo.....	
	Abstract.....	
1.0	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Panorama do HIV Pediátrico no Brasil e no mundo.....	2
1.2	Acesso à terapia antirretroviral (TARV).....	2
1.3	Diferenças do compartimento linfocitário de lactentes e estabelecimento de reservatórios virais no contexto da infecção pelo HIV.....	4
1.4	Impacto da TARV nos desfechos de saúde na criança. Ativação celular, imunossenescência e progressão pelo doença pelo HIV.....	6
1.5	Resposta à vacinação.....	13
2.0	OBJETIVOS.....	16
2.1	Objetivo geral	17
2.2	Objetivos específicos.....	17
3.0	MÉTODOS.....	18
3.1	Locais do Estudo.....	19
3.2	Desenho do estudo.....	19
3.3	População do estudo.....	19
3.3.1	Critérios de Inclusão.....	19
3.4	Recrutamento.....	20
3.5	Variáveis analisadas.....	21
3.6	Base de Dados do Estudo.....	22
3.7	Definições.....	22
3.8	Procedimentos do estudo.....	24
3.9	Tamanho amostral.....	24
3.10	Análise estatística.....	25
3.11	Aspectos éticos.....	26
3.12	Métodos laboratoriais.....	26
3.12.1	Imunofenotipagem.....	26
3.13	Estratégias de análise dos dados de citometria de fluxo.....	29

3.14	Resposta vacinal.....	32
4.0	RESULTADOS.....	34
4.1	Dados demográficos.....	35
4.2	Diagnóstico do HIV e início de terapia antirretroviral.....	37
4.3	Progressão da doença pelo HIV e idade de início da terapia antirretroviral	39
4.4	Vacinação para Hepatite B, Hepatite A, Caxumba e Rubéola.....	53
4.5	Homeostase de LTCD4+ e LTCD8+.....	60
4.6	Marcadores de senescência, apoptose, exaustão, energia e ativação em LTCD4+.....	65
4.7	Marcadores de senescência, apoptose, exaustão e ativação em LTCD8	75
4.8	Sorologias vacinais e marcadores de senescência, apoptose, exaustão e ativação em LTCD4+ e LTCD8+.....	88
4.9	Treg e marcadores de senescência, apoptose, exaustão e ativação em LTCD4+ LTCD8+.....	e 99
5.0	DISCUSSÃO.....	102
5.1	TARV precoce e a preservação de LTCD4+ e da razão LTCD4+/LTCD8+	103
5.2	TARV precoce e preservação da maturação precoce, senescência e ativação de células T.....	104
5.3	TARV precoce e resposta à vacinação.....	108
5.4	Células T reguladoras (Treg) e marcadores de ativação, maturação e exaustão celular.....	111
5.5	Limitações.....	113
6.0	CONCLUSÕES.....	114
7.0	ANEXOS.....	116
8.0	REFERÊNCIAS.....	135

Listas

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	porcentagem
AIDS	síndrome da imunodeficiência adquirida
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
cel/mm ³	células por milímetro cúbico
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico (do inglês: <i>PBMC – peripheral blood mononuclear cells</i>)
CV	carga viral
DNA	ácido desoxirribonucléico
DP	desvio padrão
HIV	vírus da imunodeficiência humana
IC	intervalo de confiança
IgG	imunoglobulina G
IL-6	interleucina-6
IMC	índice de massa corpórea
INNR	inibidor não nucleosídeo da transcriptase reversa
INTR	inibidor nucleosídeo da transcriptase reversa
IP	inibidor de protease

Kg	quilogramas
Kg/m ²	quilogramas por metro quadrado
L	litro
LIM	Laboratório de Investigação Médica
Log10	logaritmo na base 10
LTCD4+	linfócitos T CD4+ (<i>helper</i>)
LTCD8+	linfócitos T CD8+ (citotóxico)
mL	mililitro
MMR	vacina tríplice viral (do inglês: <i>measles, mumps, rubella</i>)
OMS	Organização Mundial de Saúde
RNA	ácido ribonucléico
SUS	Sistema Único de Saúde
TARV	terapia antirretroviral
TCLE	termo de consentimento livre e esclarecido
TCM	linfócito T de memória central
TEM	linfócito T de memória efetora
Th	célula T auxiliar (<i>helper</i>)
TINT	linfócito T de memória intermediária
TNF	fator de necrose tumoral

TTE	linfócito T de memória efetora terminal
TTM	linfócito T de memória transitória
Treg	célula T reguladora
UA	unidades arbitrárias
UI	unidades internacionais
UNAIDS	Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS

Tabela 1. Categorias imunológicas da classificação da infecção pelo HIV em crianças e adolescentes menores de 13 anos (Adaptado do CDC9).....	4
Tabela 2. Mecanismos de maturação celular acelerada em crianças vivendo com HIV.....	10
Tabela 3. Recomendações SBIm para vacinas da infância de interesse.....	14
Tabela 4. Variáveis de interesse para o estudo e fonte de informação.....	21
Tabela 5. Informações dos anticorpos e reagentes utilizados no painel de ativação, senescência e exaustão de LTCD4+ e LTCD8+.....	27
Tabela 6. Informações dos anticorpos e reagentes utilizados no painel de células T reguladoras.....	28
Tabela 7. Informações descrevendo a função e a finalidade de cada molécula caracterizada através dos painéis de citometria de fluxo*	29
Tabela 8. Dados demográficos dos participantes na inclusão no estudo.....	36
Tabela 9. Características dos pacientes no momento do diagnóstico da infecção pelo HIV.....	38
Tabela 10. Características dos pacientes ao início da TARV.	39
Tabela 11. Características dos pacientes na inclusão no estudo.	41
Tabela 12. Características dos pacientes ao diagnóstico da infecção pelo HIV e no início da TARV, estratificados pela idade de início da TARV.....	46
Tabela 13. Características dos pacientes na inclusão no estudo, estratificados pela idade de início da TARV.....	48
Tabela 14. Correlação da idade de início de TARV e características dos participantes na inclusão do estudo.....	52
Tabela 15. Vacinação e imunidade para Hepatite B, Hepatite A, Rubéola e Caxumba, no total de participantes e por grupos conforme idade de início de TARV.....	57
Tabela 16. Correlação entre idade de início de TARV e títulos vacinais.....	59
Tabela 17. Totais e Subpopulações de Linfócitos T CD4+, no total de participantes e nos grupos estratificados por idade de início de TARV.....	62
Tabela 18. Totais e Subpopulações de Linfócitos T CD8+, no total de participantes e nos grupos estratificados por idade de início de TARV.....	64

Figura 1. Estratégia de análise de painéis de LTCD4+, LTCD8 + e Treg completa.....	31
Figura 2. Valores absolutos e percentuais de LTCD4+ das crianças incluídas no estudo, ao diagnóstico de infecção de HIV, ao início da TARV e no momento de inclusão no estudo.....	43
Figura 3. Contagens de LTCD4+ (absoluto) e razão LTCD4+/LTCD8+ na inclusão no estudo, e contagens de LTCD4+ (absoluto) Nadir e classificação de alteração de Nadir LTCD4+, das crianças estratificadas pela idade ao início da TARV.....	51
Figura 4. Correlações entre idade de início de TARV e LTCD4+ (absoluto e %) e razão LTCD4+/LTCD8+ na inclusão, e idade de início de TARV e LTCD4+ Nadir (absoluto e %).....	53
Figura 5. Proporções de imunes para a Hepatite A, Hepatite B, Rubéola e Caxumba entre as crianças incluídas no estudo.....	54
Figura 6. Títulos de proteção para Rubéola e Caxumba, nas crianças incluídas no estudo estratificadas por idade de início de TARV, e proporções de protegidos para a Caxumba em cada grupo.	59
Figura 7. Correlações entre idade de início de TARV e títulos de proteção para a Rubéola e Caxumba.....	60
Figura 8. Heat map de marcadores de senescência, apoptose, exaustão, anergia e ativação nas subpopulações de LTCD4+. Correlação de Spearman, teste bicaudal.....	66
Figura 9. Subpopulações de LTCD4+ com marcadores de apoptose (CD95+), senescência (CD57+) e exaustão (PD-1+) em LTCD4+ com correlação positiva com idade de início de TARV.....	67
Figura 10. Marcadores de ativação celular em LTCD4+ das crianças incluídas, estratificadas pela idade de início de TARV.....	72
Figura 11. LTCD4+ com marcadores de apoptose (CD95+), de exaustão (PD-1+) e de senescência (CD57+) nas crianças incluídas no estudo: crianças iniciando TARV <6m tem menores frequências destes marcadores do que crianças iniciando TARV entre 1 e 5 a.....	73
Figura 12. Heat map de marcadores de senescência, apoptose, exaustão, anergia e ativação nas subpopulações de LTCD8+.....	78
Figura 13. Exemplos de correlações positivas entre idade de início de TARV e marcadores de apoptose (CD95+), senescência (CD57+) e exaustão (PD-1+) em LTCD8+ total.....	79
Figura 14. LTCD8+ com marcadores de apoptose (CD95+), de exaustão (PD-1+) e de senescência (CD57+) nas crianças incluídas no estudo: crianças iniciando TARV <6m tem menores frequências destes marcadores do que crianças iniciando TARV entre 1 e 5 a.....	85

Figura 15. Heat Map de correlações entre títulos de proteção para Hepatite B e marcadores de senescência, apoptose, exaustão, anergia e ativação nas subpopulações de LTCD4+ e LTCD8+.....	90
Figura 16. Heat Map de correlações entre títulos de proteção para Hepatite A e marcadores de senescência, apoptose, exaustão, anergia e ativação nas subpopulações de LTCD4+ e LTCD8+.....	93
Figura 17. Heat Map de correlações entre títulos de proteção para Rubéola e marcadores de senescência, apoptose, exaustão, anergia e ativação nas subpopulações de LTCD4+ e LTCD8+.....	96
Figura 18. Heat Map de correlações entre títulos de proteção para Caxumba e marcadores de senescência, apoptose, exaustão, anergia e ativação nas subpopulações de LTCD4+ e LTCD8+.....	99
Figura 19. Heat Map de correlações estatisticamente significantes entre marcadores de ativação e maturação de LTCD4+ e LTCD8+ e %Treg.....	101

Resumo

Thomé BC. *Senescência e exaustão de células T e resposta vacinal em crianças infectadas perinatalmente pelo HIV* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

Introdução: Como a terapia antirretroviral (TARV) atualmente permite que um número maior de crianças infectadas pelo HIV atinja a idade adulta, passam ser relevante questões como a imunossenescência precoce e a exaustão celular, semelhante ao observado em adultos infectados pelo HIV. **Objetivos:** Avaliar se a idade de início da TARV modifica os padrões de ativação imune, senescência e resposta vacinal em crianças infectadas perinatalmente pelo HIV. **Desenho do estudo:** Estudo transversal, exploratório. **Métodos:** Obtivemos dados de prontuários de pacientes e cartões de imunização e coletamos sangue para sorologias e isolamento de células mononucleares do sangue periférico (CMSP). Os critérios de elegibilidade incluíram: idade <18 anos, TARV por pelo menos 6 meses e carga viral <50 cópias/mL. Anticorpos de proteção (Ac) para Hepatite A e B, Rubéola e Caxumba foram medidos. Células T com marcadores de senescência (CD57 +), anergia (CD28-), apoptose (CD95 +), ativação (CD38 +, CCR5 +, HLA-DR +) e exaustão (PD-1 +) foram analisadas por citometria de fluxo. **Resultados:** foram incluídas 56 crianças, com idade mediana de 12 anos e tempo mediano de TARV de 9 anos. A mediana das contagens de LTCD4 + foi de 1010 células/mm³ (%mediano = 36,7%) e a média da razão LTCD4+/LTCD8+ foi de 1,6. A proteção das vacinas foi a seguinte: 80% para Hepatite A, 64% para Hepatite B, 57% para Rubéola e 44% para Caxumba. A idade mais precoce de início da TARV se correlacionou negativamente com LTCD4+ mais altos, LTCD4+ Nadir mais alto, maior razão LTCD4+/LTCD8+ e maiores títulos de Ac para a caxumba e a rubéola. Houve correlação positiva da idade de início de TARV e marcadores de ativação, apoptose, senescência e exaustão em LTCD4+ e LTCD8+. Tais marcadores se relacionaram com pior resposta vacinal. Houve benefício em crianças iniciando TARV <6m na preservação da homeostase e resposta imune. **Conclusão:** Houve benefícios do início precoce da TARV na preservação de LTCD4+ e da resposta vacinal, e na prevenção da maturação e senescência imune neste grupo de crianças perinatalmente infectadas pelo HIV.

Descritores: HIV; Transmissão vertical de doença infecciosa; Senescência celular; Ativação celular; Resposta vacinal; Terapia antirretroviral de alta atividade.

Abstract

Thomé BC. *T cell senescence and exhaustion and vaccine response in perinatally HIV infected children (PHIC)* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2019.

Background: As successful antiretroviral therapy (ART) allows a larger number of HIV-infected children to reach adulthood, issues such as early immune senescence and exhaustion arise, similar to what is seen in HIV-infected adults. **Objectives:** To evaluate whether time of ART initiation modified patterns of immune activation, senescence and vaccine response in PHIC **Design:** Cross-sectional, exploratory study. **Methods:** We obtained data from patient charts and immunization cards, and collected blood for serology and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) isolation. Eligibility criteria included age < 18 years, ART for at least 6 months and viral load < 50 RNA copies/mL. Protective antibodies (Ab) for Hepatitis A and B, Rubella and Mumps were measured. T cells with markers for senescence (CD57+), anergy (CD28-), apoptosis (CD95+), activation (CD38+, CCR5+, HLA-DR+) and exhaustion (PD-1+) were analyzed by flow cytometry. **Results:** 56 children were included: their median age was 12 years and median time on ART was 9 years. Median LTCD4+ counts were 1010 cells/mm³ (median % 36,7%) and mean LTCD4+/LTCD8+ ratio was 1.6. Vaccine protection was as follows: 80% for Hepatitis A, 64% for Hepatitis B, 57% for Rubella and 44% for Mumps. Earlier age at ART initiation was negatively correlated with higher LTCD4+, higher nadir LTCD4+, higher LTCD4+/LTCD8+ ratio, and higher Ab titers for Mumps and Rubella. There was positive correlation of age at ART initiation and activation, apoptosis, senescence and exhaustion markers in LTCD4+ and LTCD8+. Markers correlated with poorer vaccine response. There was benefit in children starting ART <6m in preserving immune homeostasis and response. **Conclusion:** There were benefits of early ART initiation in preserving LTCD4+ and vaccine response, and in preventing immune maturation and senescence in this group of PHIC.

Descriptors: HIV; Infectious disease transmission, vertical; Cellular senescence; Cellular activation; Vaccine response; Antiretroviral therapy, highly active.

1. Introdução

1.1 Panorama do HIV Pediátrico no Brasil e no mundo

O UNAIDS estima que em 2017 o número de crianças abaixo de 15 anos vivendo com o HIV globalmente era de 1,8 milhões (1,3–2,4 milhões) ¹. Estima-se que a enorme maioria das infecções nesta faixa etária ocorram através de transmissão perinatal ². Por conta de cada vez mais eficazes medidas de prevenção da transmissão perinatal, novas infecções pelo HIV em crianças caíram em 35% de 2010 a 2017 mundialmente: em 2017 houve 180 mil (110 -260 mil) novas infecções pediátricas em comparação a 270 mil (170 – 400 mil) em 2010 ¹. O número de novas infecções pelo HIV entre crianças, porém, segue inaceitável, haja vista a possibilidade de prevenção. Na América Latina houve 2400 (1800-3600) novos casos de infecção pelo HIV em crianças em 2017 ¹. Além disso, em 2017, segundo estimativas do UNAIDS, mais de 30% das novas infecções em adultos mundialmente ocorreu em pessoas jovens (15–24 anos) ³. No Brasil o diagnóstico da infecção pelo HIV em jovens é também preocupante e o Ministério da Saúde chama a atenção para a necessidade de intensificação de estratégias específicas para este grupo ⁴.

Dados apontam para o fato de que no Brasil houve nos últimos 10 anos uma diminuição de 42% na incidência de casos de AIDS em menores de cinco anos, utilizada como *proxy* de transmissão perinatal do HIV, passando para 2,0 casos/100.000 habitantes em 2017. Essa diminuição não foi observada, porém, na mesma dimensão em todas as regiões: na região Norte observou-se a menor taxa de diminuição (20%) dessa taxa. Considerando as taxas de detecção de AIDS em menores de cinco anos por Estados, no ano de 2017 o Amapá e o Rio Grande do Sul apresentaram as taxas mais altas: 6,5 e 6,0 casos/100 mil habitantes, respectivamente ⁴.

Nota-se, portanto, que apesar da tendência observada mundialmente de diminuição de novos casos de HIV, a população pediátrica e de adultos jovens segue representando importante fração das pessoas vivendo com HIV no mundo e no Brasil.

1.2 Acesso à terapia antirretroviral (TARV)

Segundo estimativas do UNAIDS em 2017 aproximadamente 52% (33–70%) das crianças mundialmente infectadas pelo HIV estavam em tratamento antirretroviral,

uma proporção que representa um aumento significativo em relação a 21% (18-23%) em 2010, porém que denota um grande número de crianças que ainda não tem acesso ao tratamento ³. A Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2015 reviu as recomendações ⁵ para início da TARV de 2013 ⁶, e as incorporou nas recomendações consolidadas em 2016 ⁷, para recomendar que a TARV fosse iniciado em todas as pessoas vivendo com HIV inclusive crianças e adolescentes, independentemente da contagem de LTCD4+ ^{5,7}. Enquanto para adultos essa era uma recomendação considerada forte, pela alta qualidade da evidência que a suportava, para crianças e adolescentes ela era considerada condicional, pela baixa qualidade de evidência disponível. Mesmo com esta limitação, especificamente para os grupos etários das crianças e adolescentes as novas recomendações representaram uma expansão das recomendações de 2013, alinhando as recomendações de todas as crianças e adolescentes com recomendações dos adultos, de início universal do TARV para todas as pessoas vivendo com o HIV.

No Brasil, o início da TARV também sempre se determinou através de critérios de progressão da doença, clínicos ou laboratoriais, tanto para adultos como para crianças. A partir de 2009 porém, o Ministério da Saúde passou a recomendar o início da TARV a todas as crianças abaixo de 12 meses, independentemente de critérios clínicos e laboratoriais ⁸. Para as outras faixas etárias o início da TARV continuava a ser instituído com base em critérios clínicos definidos pelo *Centers for Diseases Control and Prevention* (CDC) ⁹ e laboratoriais que indicassem a progressão da doença, tais como contagem de LTCD4+ e carga viral (CV). Entre 1 e 4 anos estava indicada a TARV nas crianças em classificação clínica CDC B (exceto pacientes com apenas 1 episódio de pneumonia bacteriana) ou C, ou apresentando níveis percentuais de LTCD4+ inferiores 25%, ou carga viral igual ou superior a 100.000 cópias. A partir dos 5 anos de idade deviam iniciar TARV crianças em classificação clínica CDC B (exceto pacientes com apenas 1 episódio de pneumonia bacteriana) ou C, ou com níveis de LTCD4+ inferior a 500, ou carga viral igual ou superior a 100.000 cópias ¹⁰.

Para adultos a partir de 2013 o Ministério da Saúde passou a estimular o início do TARV a todas as pessoas vivendo com o HIV, independentemente da contagem de LTCD4+ ¹¹, e a partir de 2017 essa recomendação se estendeu também às crianças diagnosticadas com infecção pelo HIV ¹². No Brasil a distribuição gratuita de medicação antirretroviral pelo SUS desde 1996 contribui para as altas taxas de cobertura de tratamento: dados do UNAIDS de 2017 apontam que em 2017 64% [47 -

83] dos adultos e 45% [26 - 62] das crianças vivendo com HIV estavam em TARV no país ¹³.

1.3 Diferenças do compartimento linfocitário de lactentes e estabelecimento de reservatórios virais no contexto da infecção pelo HIV

Lactentes e crianças apresentam um perfil de LTCD4+, principal alvo da infecção pelo vírus HIV, muito diferente ao de adolescentes e adultos. Valores totais e percentuais de LTCD4+ circulantes em lactentes e crianças são muito maiores que em adultos – valores totais chegam a ser três a quatro vezes mais altos em lactentes que em adultos, e a partir daí declinam até se aproximarem dos valores encontrados em adultos ao redor dos 6 anos de idade (revisado em ¹⁴). Dessa forma os parâmetros utilizados para definir graus de imunodeficiência em crianças variam conforme a faixa etária, e estão descritos na Tabela 1. Vale lembrar que estes são os parâmetros utilizados pelo Ministério da Saúde para a classificação da infecção pelo HIV em crianças e adolescentes até os 12 anos de idade ¹².

Tabela 1. Categorias imunológicas da classificação da infecção pelo HIV em crianças e adolescentes menores de 13 anos (Adaptado do CDC ⁹).

CLASSIFICAÇÃO IMUNOLÓGICA	IDADE NA DATA DA CONTAGEM DE LINFOCITOS T CD4+					
	< 1 ano		1 ano < 6 anos		6 anos <13 anos	
	céls/mm3	%	céls/mm3	%	céls/mm3	%
1 - Ausente/sem	≥1500	≥25	≥1000	≥25	≥500	≥25
2 - Moderada	750-1499	15 - 24	500-999	15 - 24	200-499	15 - 24
3 - Grave	<750	< 15	<500	< 15	<200	< 15

Em lactentes há também um predomínio de subpopulações de LTCD4+ naíve, e menores proporções de subpopulações de memória central e memória efetora ¹⁴, o que poderia apresentar-se como oportunidade para cura se a TARV for instituída precocemente, já que os LTCD4+ de memória constituem reservatórios virais importantes na infecção pelo HIV ¹⁵. Em um estudo que observou crianças expostas

ao HIV, não infectadas, apesar de supressão viral materna adequada no momento do parto, demonstrou-se que crianças expostas pelo HIV apresentaram níveis mais baixos de células T naïve, e níveis maiores de ativação celular que se mantiveram até pelo menos os 12 primeiros meses de idade, sugerindo que a exposição intra-útero ao HIV mesmo sem infecção pode causar anormalidades sutis do sistema imune ¹⁶. Além disso, ao nascimento o recém nascido apresenta três vezes o número de células T reguladoras (T regs) encontrado em adultos, número esse que era maior ainda intra-útero, possivelmente uma resposta do feto aos antígenos maternos e externos ¹⁴. Apesar de achados muitas vezes conflitantes acerca da função das células Treg no contexto do HIV, de forma geral elas parecem estar implicadas na modulação da resposta imune específica contra o HIV, e na inflamação e ativação imune geradas pela infecção pelo HIV ¹⁷.

Em uma situação de infecção perinatal pelo HIV, existe uma inabilidade do sistema imune em apresentar resposta adequada contra o vírus, e uma rápida depleção de LTCD4+ se dá - na maioria das crianças - de maneira inversamente proporcional ao aumento da viremia ^{15,18}. Nos lactentes a resposta imune inata funciona de maneira diferente do observado nos adultos, no sentido de preferenciar citocinas produzidas por estimulação da via Th2/Th17 em lugar da via Th1, deixando-os mais suscetíveis à infecção pelo HIV ¹⁵. A resposta imune adaptativa dos recém-nascidos e lactentes infectados pelo HIV, embora presente segundo estudos que demonstraram resposta precoce de LTCD8+ e LTCD4+ frente à infecção perinatal pelo HIV, parece porém menor em magnitude se comparada à observada em adultos, e disfuncional ^{19,20}. Frequentemente lactentes que são iniciados em TARV precocemente não chegam a apresentar anticorpos anti-HIV específicos ou mesmo resposta de LTCD8+; ao contrário de crianças que são tratadas mais tardiamente, portanto atingindo supressão viral mais tarde durante a infância, e que apresentam resposta imune ao HIV de linfócitos B e T similar à observada em adultos ²¹.

Uma definição proposta para remissão e cura do HIV, em particular para as crianças, se refere à supressão viral sustentada na ausência de TARV, com níveis normais de LTCD4+ e preservação da resposta imune para garantir resposta à vacinação ²². Reservatórios do vírus HIV em LTCD4+ de memória são estabelecidos rapidamente após infecção pelo vírus apesar de supressão viral de longo prazo e constituem uma barreira para a parada programada de antirretrovirais ou mesmo para a erradicação do HIV em crianças. Há vários sítios anatômicos responsáveis pela persistência do HIV em reservatórios porém o compartimento de LTCD4+ de memória

latente parecem contribuir largamente para o estabelecimento de reservatórios virais por conter material genômico viral passível de replicação em determinadas situações de ativação imune ²³. Entretanto, de forma análoga ao que se observa em adultos tratados precocemente no curso da infecção pelo vírus ²⁴, o tamanho deste reservatório parece diminuir em situações de supressão viral a longo prazo e de forma mais radical em crianças que iniciam TARV mais precocemente ou que estabelecem supressão viral em idades mais precoces ^{22,25-27}. Entretanto, em contraste com os achados de reservatórios de adultos em TARV, em que grande parte do genoma viral encontrado está intacto, e é replicação-competente (o que define a presença de *reservatórios latentes*), a pesquisa de reservatórios em crianças que iniciaram a TARV precocemente (antes dos primeiros seis meses de vida) e que mantinham supressão viral a longo prazo não demonstrou a preservação de genomas intactos do HIV, mas sim a persistência de uma maioria absoluta de genomas de replicação defeituosa. Esse achado deve corroborar com a diminuição do reservatório viral com a TARV a longo prazo ²⁸. Um estudo que mensurou o tamanho e tempo de decaimento do reservatório de HIV em LTCD4+ latentes durante os primeiros anos de TARV, iniciada entre dois e seis meses de idade, demonstrou que crianças com supressão viral mais lenta apresentavam maior frequência de LTCD4+ latentes infectados pelo HIV aos dois anos de TARV, o que apoia a interação entre reservatório latente e viremia plasmática ²⁹.

1.4 Impacto da TARV nos desfechos de saúde na criança. Ativação celular, imunossenescência e progressão pela doença pelo HIV

A observação da história natural da infecção perinatal pelo HIV demonstrou diferentes padrões de progressão da doença nas crianças ³⁰. Na maioria delas na ausência de terapia antirretroviral a progressão da doença se dá de forma mais rápida e agressiva do que nos adultos, levando à síndrome de imunodepressão adquirida em 1 a 5 anos ^{31,32}, e determina altas taxas de mortalidade nos primeiros anos de vida (50% até os 2 anos, e 60% até os 2,5 anos ^{33,34}. Estes são chamados comumente de progressores rápidos. Por outro lado, 5-10% ^{35,36} das crianças infectadas perinatalmente chegam à idade escolar mantendo níveis adequados de LTCD4+ na ausência de terapia antirretroviral e são chamados comumente de progressores lentos (em inglês: *long-term non-progressors*). Diferentemente dos adultos controladores de elite (em inglês: *elite controllers*), em que a carga viral permanece baixa ou

indetectável, mecanismo que parece ser, entre os adultos, responsável por diminuir os níveis de ativação imune celular, diretamente relacionada à progressão da doença, os progressores lentos pediátricos mantêm níveis baixos de ativação celular apesar de apresentarem carga viral mais elevada ^{32,37}. Mecanismos de não progressão da doença nas crianças são então, menos conhecidos.

Entre adultos infectados pelo HIV, apesar da TARV ter alterado a história natural da doença pela infecção pelo HIV, transformando-a numa doença crônica, antirretrovirais não parecem ser capazes de reestabelecer plenamente a função do sistema imune ³⁸, e nota-se maior prevalência de complicações não-AIDS neste grupo ^{39,40}, inclusive neoplasias, que parecem estar relacionadas ao envelhecimento precoce estimulado pelo HIV ^{41,42}. As alterações observadas na doença crônica pelo HIV no que diz respeito às funções do sistema imune assim como no funcionamento geral do organismo se assemelham ao processo normal de envelhecimento em pessoas não infectadas pelo HIV, e a aceleração do envelhecimento observada numa situação de infecção pelo HIV parece estar intimamente relacionada ao estado de inflamação crônico que pessoas vivendo com HIV experimentam, apesar da TARV de sucesso ⁴²⁻⁴⁵. Alterações promovidas por este estado de inflamação e ativação do sistema imune que contribuem para o envelhecimento precoce incluem menor renovação de células T e alteração da sua homeostase, predomínio de células T diferenciadas com telômeros mais curtos, função alterada das células T reguladoras (Treg), normalmente responsáveis pela regulação da inflamação, acumulação de mediadores inflamatórios como TNF-alfa e interleucinas como a IL-6, e finalmente, pela destruição da barreira da mucosa gastrointestinal ^{43,44}. A permanência de vírions circulantes, com ou sem capacidade replicativa, parece estimular o sistema imune contribuindo para seu envelhecimento ⁴⁶. Também foi sugerido que a exposição a antirretrovirais poderia contribuir para o envelhecimento do sistema imune ^{47,48}.

Há menos relatos sobre a imunossenescência precoce em crianças e adolescentes vivendo com HIV porém algumas características da história natural da infecção e progressão da doença em especial nas crianças infectadas perinatalmente pelo HIV sugerem que o envelhecimento precoce do sistema imune pode ser ainda mais acentuado em crianças: progressão mais rápida da doença, altas cargas virais no estabelecimento da infecção, imaturidade do sistema imune particularmente adaptativo resultando no controle mais demorado da viremia, e, finalmente, exposição prolongada e precoce a antirretrovirais ⁴⁹.

Em termos de marcadores biológicos das alterações ligadas à ativação celular e ao envelhecimento precoce observadas em células T, a marcação com CD38+ em particular de LTCD8+ foi há muito associada a este estado de ativação e relacionado à progressão da doença pelo HIV^{50,51}. A dupla marcação de linfócitos com CD38+HLA-DR+ classicamente está associada com ativação e progressão da doença^{52,53}. O receptor de membrana CCR5 está ligado à susceptibilidade à infecção pelo HIV, e também à progressão da doença em indivíduos infectados pelo HIV^{54,55}. O receptor de membrana CD95 está envolvido na morte acelerada de linfócitos T no contexto de infecção pelo HIV, através da indução de apoptose, e é considerado marcador de exaustão e ativação celular⁵⁶⁻⁵⁹. A diminuição e finalmente perda da expressão de CD28, importante marcador do potencial de proliferação de linfócitos T e consequentemente importante para a manutenção da sua função, foi por sua vez há muito relacionada ao envelhecimento⁶⁰. Paralelamente, células T que perdem sua capacidade proliferativa aumentam a expressão do marcador CD57^{60,61}. PD-1 (*Programmed Death -1*) é um marcador inibitório que tem papel importante no equilíbrio entre ativação celular e tolerância, e está associado com perda da capacidade proliferativa de linfócitos e portanto considerado um marcador de exaustão⁶²⁻⁶⁴. Adicionalmente aos marcadores clássicos de imunossenescência e exaustão, Tandon R et al sugeriram que a maior expansão de Tim-3 (*T-cell immunoglobulin and mucin domain-containing molecule-3*), receptor inibitório que diminui a resposta de células T, em LTCD4+ e LTCD8+ de crianças de mais idade, ou seja, expostas ao HIV há mais tempo, poderia funcionar como marcador da disfunção de células T⁶⁵. Outros estudos demonstraram perfil senescente em crianças em replicação viral através da medição do comprimento de telômero^{49,66}. De forma geral estudos mostram que ativação celular e exaustão do sistema imune estão inversamente correlacionados com comprimento de telômero, o que apoia a ideia de que a ativação imune persistente e exaustão celular estão proximamente relacionadas ao envelhecimento e imunossenescência^{49,67}. Neste sentido, técnicas de medição do comprimento de telômero⁶⁸ e atividade da telomerase^{69,70}, responsável pela manutenção do comprimento do telômero podem ser utilizadas para avaliar senescência no contexto da infecção pelo HIV.

A Tabela 2 resume as principais referências bibliográficas que descreveram os mecanismos implicados no envelhecimento precoce celular de crianças vivendo com HIV (adaptado de⁶⁷):

Tabela 2. Mecanismos de maturação celular acelerada em crianças vivendo com HIV.

Características/mecanismos de maturação acelerada do perfil celular de crianças infectadas pelo HIV	Referências
Aumento de células T CD95+	Debatin KM et al, 1994
	Vigano A et al, 2001.
	Sainz T et al, 2013
Diminuição de LTCD8+ naïve / Aumento de LTCD8+ de memória efetora/ Aumento de LTCD8+ de diferenciação terminal	van den Heuvel D et al, 2015
	Mansoor N et al, 2009
	Montesano C et al, 2010
	Zacarelli Filho et al, 2007
	Sainz T et al, 2013
Diminuição de LTCD4+ naïve / Aumento de LTCD4+ de memória efetora	Méndez-Lagares et al, 2013
	Zacarelli Filho et al, 2007
Aumento de LTCD8+CD28-CD57+ / linfócitos senescentes CD28-	Plaeger-Marshall S et al, 1994
	Mansoor N et al, 2009
	Diaz L et al, 2012
	Vigano A et al, 2001.
	Gianesin K et al, 2016
Aumento de LTCD4+ total, de memória central, efetora e efetora terminal com perfil LTCD4+CD28- CD57+	Méndez-Lagares et al, 2013
Aumento de LTCD8+ ativados - CD8+CD38+/CD8+CD38+HLA-DR+	Prendergast A et al, 2012
	Plaeger-Marshall S et al, 1994
	Sainz T et al, 2013
	Alvarez P et al, 2017
	Zacarelli Filho et al, 2007
	Gianesin K et al, 2016

Tabela 2. Mecanismos de maturação celular acelerada em crianças vivendo com HIV (continuação).

Aumento de LTCD4+ ativados - CD4+CD38+HLA-DR+	Alvarez P et al, 2017
	Plaeger-Marshall S et al, 1994
Aumento de células exaustas - PD-1+	Foldi J et al, 2017
	Prendergast A et al, 2012
	Gianesin K et al, 2016
Razão LTCD4/LTCD8 invertida	Alvarez P et al, 2017
	Sainz T et al, 2013
Expansão do receptor inibitório Tim-3	Tandon R et al, 2012

O efeito benéfico da TARV iniciada de maneira mais precoce na diminuição de marcadores de envelhecimento e ativação celular e na redução do estabelecimento de reservatórios latentes do HIV vem sendo há alguns anos explorado, já que níveis mais altos de ativação e senescência celular assim como maiores reservatórios do vírus parecem estar associados a piores prognósticos em termos de progressão da doença. Em um estudo realizado em adultos, o início da TARV até 6 meses de infecção, ou seja, em estágios precoces da doença, associou-se com menores níveis de ativação celular e reservatórios menores de DNA e RNA de HIV ⁷¹.

Em crianças, desde o estudo CHER ⁷², outros estudos confirmaram os benefícios da TARV iniciada de maneira precoce, no primeiro ano de vida, inclusive garantindo supressão viral mais rápida ⁷³. O benefício da TARV mais precoce nos maiores de 12 meses, porém, foi mais difícil de ser estabelecido: por exemplo um ensaio clínico randomizado (PREDICT) cuja mediana de idade das crianças incluídas era de 6 anos, não encontrou diferenças na mortalidade entre dois grupos de crianças iniciando TARV mais precocemente vs. tardiamente, porém o estudo não teve poder suficiente para detectar essa diferença pela baixa mortalidade encontrada pelos pesquisadores nos dois grupos ⁷⁴. Em um relato da coorte leDEA de crianças infectadas pelo HIV na África Ocidental, investigadores observaram que a idade mais precoce de início da TARV (antes dos 3 anos) estava relacionada com melhor recuperação do sistema imune, medido pela contagem de LTCD4+ aos 24 meses pós início da terapia ⁷⁵. De forma semelhante, resultados de modelagem derivados

do ensaio clínico ARROW demonstraram que contagens de LTCD4+ mais altas, e mantidas a mais longo prazo estavam previstas para crianças iniciando TARV em idades mais precoces ⁷⁶. Coortes importantes de pacientes pediátricos (*Pediatric AIDS Clinical Trials Group - PACTG*) seguidos ao longo do tempo pré e pós TARV já indicaram o aumento percentual substancial de LTCD4+ com o início da TARV, em especial no primeiro ano de instituição da TARV, e já apontavam para um maior aumento de LTCD4+ nas crianças de idade inferior a cinco anos ⁷⁷.

Neste estudo, que contou com 1236 participantes, a média de LTCD4+ após cinco anos de TARV foi, contudo, inferior à média esperada para a idade, sugerindo uma resposta imune incompleta ⁷⁷, em contraste com outros estudos que demonstraram que após quase três anos de TARV as subpopulações de LTCD4+ eram semelhantes às dos indivíduos controle ⁷⁸. Ambos estudos citados foram publicados no ano de 2008. Desde então estudos mais detalhados acerca do sistema imune e a manutenção de suas funções vem sendo realizados com o objetivo de aumentar a compreensão dos benefícios da TARV bem como de formas de otimizá-la no grupo pediátrico.

Outros estudos sugerem que o início precoce da TARV nas crianças preserve o compartimento de memória de células B, e que tal achado seja semelhante aos benefícios imune vistos em adultos tratados durante a infecção aguda ^{79,80}. Diversos estudos parecem apontar para os benefícios da TARV para a melhora de múltiplos desfechos de saúde (crescimento e desenvolvimento, sobrevida e morbidade, desfechos imunes, etc.) inclusive para crianças com níveis de LTCD4+ acima daqueles que historicamente indicariam TARV nesse grupo ^{81,82}. Vários estudos confirmam o efeito benéfico da TARV no crescimento e estado nutricional das crianças, principalmente se considerados os primeiros anos de tratamento, período em que ocorre um “catch up” dos parâmetros de crescimento como peso para idade e estatura para idade ^{83,84}, com ou sem supressão viral completa ⁸⁵. Estudos sugerem porém que crianças que já apresentam comprometimento importante como mal nutrição (baixo peso para idade, ou *wasting*) ou baixa estatura (baixo peso para estatura, ou *wasting*) no início da TARV parecem não chegar a parâmetros normais de crescimento a médio prazo ^{83,84}.

1.5 Resposta à vacinação

Sabe-se que a infecção pelo HIV altera a resposta do sistema imune às vacinas: crianças infectadas pelo HIV mais raramente atingem níveis normais de proteção, e aquelas que atingem proteção apresentam queda maior e mais rápida da mesma ⁸⁶⁻⁸⁸. Estes entre outros fatores poderiam contribuir para uma proteção falha das crianças vivendo com HIV contra doenças normalmente evitáveis através da vacinação. Estudos que exploraram a resposta imune a determinadas vacinas individualmente, tais como Hepatite B, pneumococo e sarampo, descrevem uma resposta alterada tanto da imunidade celular quanto humoral de adultos e crianças infectados pelo HIV ⁸⁹⁻⁹¹. Em um estudo realizado em São Paulo, Brasil, resultados apontaram para o fato que anticorpos vacinais contra tétano, difteria, sarampo, rubéola e hepatite B estavam presentes em grande parte das crianças estudadas mas com títulos mais baixos nas crianças infectadas pelo HIV, corroborando com a hipótese de que crianças infectadas pelo HIV apresentam uma resposta inadequada à vacinação se comparada à resposta de crianças não infectadas pelo HIV ⁹². De forma semelhante, em estudo referente à soroproteção para sarampo em um grupo de crianças e adolescentes já em TARV, no momento de inclusão no estudo aproximadamente metade dos participantes não apresentavam níveis de anticorpos protetores, apesar de terem sido vacinados previamente, em 80% dos casos tendo recebido duas doses da vacina, porém anteriormente ao início da TARV ⁹⁰.

Por outro lado, uma vez em TARV as crianças infectadas pelo HIV respondem bem à vacinação, atingindo níveis protetores de anticorpos, principalmente quando iniciada precocemente (em especial abaixo dos 12 meses de idade) ^{6,72}. No estudo referido acima sobre soroproteção contra o sarampo, as crianças revacinadas quando já em TARV tiveram um aumento de quase 90% de soroproteção, particularmente nas crianças com supressão viral ⁹⁰. Mesmo em TARV, porém, crianças infectadas pelo HIV parecem atingir menor proteção em relação às vacinas em especial àquelas recebidas anteriormente ao início da TARV. Como exemplo, um estudo realizado nos Estados Unidos examinando a resposta à vacinação com a tríplice viral, ou MMR (sarampo, caxumba e rubéola, do inglês: *measles, mumps, rubella*) em crianças expostas ao HIV infectadas ou não infectadas encontrou que altas proporções de crianças infectadas pelo HIV (mas não as expostas não infectadas) não apresentavam resposta sorológica satisfatória à vacina,

apesar de terem sido vacinadas como preconizado, e estarem em TARV ⁹³. A resposta insatisfatória às vacinas pode justificar esquemas de revacinação, em especial para aquelas vacinas administradas antes do início da TARV, embora o momento ideal de revacinação, e o número de doses de reforço necessárias não estejam bem definidos e normatizados ⁶. Neste sentido, Rainwater-Lovett K e Moss WJ utilizaram a imunidade para a vacina contra o sarampo como modelo para explorar os benefícios da revacinação de crianças infectadas com HIV pós reconstituição imune e assim justificar a política de revacinação ⁹⁴. Particularmente para a Hepatite B, o Ministério da Saúde recomenda dosar anti-HBs das crianças infectadas pelo HIV 1 a 2 meses após o esquema básico descrito na Tabela 3, e anualmente a seguir. Caso a criança não esteja protegida (anti-HBs <10 MUI/mL), deve-se repetir o esquema em intervalos de zero, dois e seis meses, usando dose dobrada da vacina Hepatite B monovalente ¹².

Para as vacinas cujas respostas foram avaliadas neste estudo, a Tabela resume as recomendações de vacinação da Sociedade Brasileira de Imunizações (SBIIm) para crianças e adolescentes infectados pelo HIV ⁹⁵.

Tabela 3. Recomendações SBIIm para vacinas da infância de interesse.

VACINA	ESQUEMA RECOMENDADO PARA CRIANÇAS E ADOLESCENTES INFECTADOS PELO HIV
HEPATITE A	Duas doses com intervalo de 6 meses.
HEPATITE B	Quatro doses: 0 - 1 - 2 - 6 meses, com o dobro da dose. Solicitar anti-HBs 1 a 2 meses após a quarta dose. Considera-se imunizado se Anti HBs ≥ 10 UI/ml. Se sorologia negativa, indicada revacinação com dose dobrada.
TRIPLICE VIRAL	Duas dose com intervalo mínimo de 1 mês; iniciar após os 12 meses. Contra indicada se imunossupressão grave.

Além dos fatores expostos acima, dados de cortes de pacientes na América Latina alertam para o fato de que o acesso às vacinas rotineiras da infância pode estar prejudicado nas crianças vivendo com HIV, o que poderia ser explicado pela possível sintomatologia apresentada pelas crianças, ou por percepções errôneas do pessoal de saúde quanto à vacinação deste grupo de crianças,

contribuindo ainda mais para uma proteção falha das doenças que as vacinas do calendário vacinal pretendem prevenir ⁹⁶. Dados semelhantes de menor cobertura vacinal entre as crianças vivendo com HIV foram observados inclusive em locais de maiores recursos, como o Reino Unido ⁹⁷.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Analisar se a idade de início da TARV modifica padrões de envelhecimento e de ativação celular e resposta imune em crianças infectadas perinatalmente pelo HIV.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar a relação entre idade de início de TARV e preservação de LTCD4+ medida através da contagem e percentual de LTCD4+;
- Analisar a relação entre a idade de início da TARV e perfil fenotípico de imunossenescência e exaustão através da medição de frequências de LTCD4+ e LTCD8+ marcados com CD57+, CD95+, PD-1+ e CD28- e Treg;
- Analisar a relação entre a idade de início da TARV e perfil fenotípico de ativação celular através da medição de frequências de LTCD4+ e LTCD8+ marcados com CCR5+, CD38+ e HLA-DR+ e Treg;
- Analisar a relação entre a idade de início da TARV e resposta imune a vacinas para Hepatite B, Hepatite A, Caxumba e Rubéola.

3 Métodos

3.1 Locais do Estudo

A população em estudo trata-se de crianças e adolescentes provenientes de duas coortes de pacientes infectados pelo HIV em seguimento nos seguintes serviços: ambulatório de doenças infecciosas do Serviço de Infectologia Pediátrica do Instituto de Infectologia Emilio Ribas (IIER), e ambulatório de infectologia pediátrica do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (ICr-HC-FMUSP), ambos reconhecidos no Brasil e mundialmente pelo cuidado e tratamento de crianças e adolescentes infectados pelo HIV.

3.2 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo transversal, exploratório, de marcadores da resposta imune, imunossenescência e ativação celular numa subpopulação de pacientes em cuidado (crianças e adolescentes <18 anos) recebendo TARV com sucesso, tendo iniciado TARV em diferentes idades e em diferentes graus de imunossupressão e evolução da doença.

3.3 População do estudo

3.3.1 Critérios de Inclusão

Participaram neste estudo crianças e adolescentes que preencheram os seguintes critérios de inclusão:

- Idade inferior a 18 anos completos,
- Infecção pelo HIV de transmissão presuntiva perinatal,
- Em TARV há mais de seis meses pelo menos,
- Carga viral (CV) inferior a 50 cópias no último controle, há no máximo seis meses,
- Paciente e cuidador concordaram com a participação no estudo segundo termos de assentimento da criança quando apropriado e consentimento do responsável.

3.4 Recrutamento

Pais ou responsáveis de pacientes em seguimento nos ambulatórios que se encaixassem nos critérios de elegibilidade para o estudo foram abordados pelo médico assistente quanto à participação no mesmo. Os pais ou responsáveis que demonstraram interesse em conhecer melhor o estudo foram direcionados ao pesquisador do estudo que então forneceu informação detalhada acerca do estudo e dos procedimentos relacionados à participação, pessoalmente ou pelo telefone quando o contato era disponibilizado pelos pais/responsáveis ao médico assistente.

Pelo menos um dos pais ou responsáveis que demonstraram interesse em participar no estudo passaram pelo processo de consentimento livre e esclarecido conforme o termo de consentimento (TCLE), e as crianças e adolescentes que conheciam seu diagnóstico de infecção pelo HIV passaram pelo processo de assentimento. Duas versões de termos de assentimento foram disponibilizadas como suporte para o processo de assentimento: uma versão de linguagem simplificada e visual para crianças menores, e outra versão para adolescentes. Como ambas versões de termos de assentimento continham explicação sobre a infecção pelo HIV, estas só puderam ser utilizadas quando a revelação diagnóstica da infecção pelo HIV tinha já sido completamente realizada.

3.5 Variáveis analisadas

O estudo contou com as seguintes fontes de dados:

- 1) Prontuário médico,
- 2) Carteira de vacinação, quando disponível,
- 3) Anamnese dos participantes e/ou pais ou responsáveis para completar as informações não disponíveis em prontuário médico e carteira de vacinação,
- 4) Resultados de exames laboratoriais.

As variáveis de interesse assim como as respectivas fontes de informação estão descritas na Tabela 4:

Tabela 4. Variáveis de interesse para o estudo e fonte de informação.

Variável de Interesse	Fonte
<ul style="list-style-type: none"> • Características sócio demográficas dos pacientes: sexo, idade, idade de diagnóstico do HIV, escolaridade dos pais/ cuidadores e do indivíduo, exercício de trabalho remunerado, com quem vive. 	<ul style="list-style-type: none"> • Prontuário médico, informação direta dos participantes/ pais/ responsáveis legais.
<ul style="list-style-type: none"> • Parâmetros clínicos ao diagnóstico pelo HIV: idade de diagnóstico, LTCD4+ e CV, classificação clínica, dados antropométricos. 	
<ul style="list-style-type: none"> • Parâmetros clínicos relativos à terapia antirretroviral: idade e dados antropométricos, LTCD4+ e CV de início de tratamento, LTCD4+ nadir, tempo de supressão viral, ARVs utilizados, interrupções de TARV. 	
<ul style="list-style-type: none"> • Parâmetros clínicos à inclusão: idade, último LTCD4+, dados antropométricos. 	
<ul style="list-style-type: none"> • Anticorpos vacinais: Hepatite B, Hepatite A, rubéola e caxumba. 	<ul style="list-style-type: none"> • Soro.
<ul style="list-style-type: none"> • Dados de Vacinação: número total de doses e data da última dose das vacinas para Hepatite B, Hepatite A e tríplice/tetra viral. 	<ul style="list-style-type: none"> • Carteira de vacinação.
<ul style="list-style-type: none"> • Biomarcadores de ativação e imunossenescência celular, razão LTCD4+/LTCD8+: Painel de Ativação LTCD4+ e LTCD8+; Painel de Treg. 	<ul style="list-style-type: none"> • PBMC.

3.6 Base de Dados do Estudo

Dados coletados através das diversas fontes de informação citadas foram inseridos numa base de dados específica para o estudo, na plataforma RedCAP (Research Electronic Data Capture) ⁹⁸. Um dicionário de variáveis de interesse (listadas acima) para o estudo foi elaborado previamente à criação da base de dados no RedCAP, tendo como base principalmente variáveis estudadas e reportadas na literatura revisada por pares relevantes para a pergunta de pesquisa do estudo. Estas variáveis foram organizadas em formulários de relato de caso (do inglês *case report form – CRF* ⁹⁹), desenvolvidos na plataforma RedCAP. Tais CRFs foram criados para registrar, sempre que disponíveis, dados demográficos dos pacientes, dados acerca dos momentos de inclusão no estudo, de diagnóstico da infecção pelo HIV, de início e ao longo da terapia antirretroviral, status atual dos pacientes, histórico vacinal, observações gerais, e resultados laboratoriais. Uma ficha de coleta de dados foi então criada para ser preenchida à mão no momento da coleta de dados, à partir das fontes de dados supracitadas. As informações coletadas nas fichas de coleta de dados foram posteriormente inseridas na plataforma RedCAP do estudo. Laudos de resultados laboratoriais foram inseridos diretamente na plataforma RedCAP.

3.7 Definições

A infecção pelo HIV de transmissão perinatal foi considerada quando previamente confirmada ou presumida pelos médicos assistentes dos pacientes incluídos no estudo, na ausência de teste confirmatório para o HIV materno.

A data de diagnóstico do HIV, quando não claramente expressa no prontuário médico, foi considerada como o primeiro resultado de carga viral confirmatória de infecção pelo HIV registrada no prontuário médico.

Dados de classificação clínica dos pacientes incluídos foram retirados do prontuário médico quando disponíveis, e seguem os critérios do CDC de progressão da doença pelo HIV ⁹, conforme as recomendações nacionais de manejo da infecção pelo HIV em crianças ¹⁰.

Terapia antirretroviral com boa resposta virológica foi definida como tratamento há pelo menos seis meses e carga viral inferior a 50 cópias/ml no último controle, realizado há no máximo seis meses. Pacientes e/ou seus responsáveis foram questionados sobre possíveis episódios de interrupção de TARV desde o seu início, e a informação oferecida foi confirmada por prontuário médico. Em caso de discrepância na informação, prevaleceu aquela disponível em prontuário. Foram considerados episódios de interrupção de TARV de qualquer duração.

Os dados de peso e estatura na inclusão do estudo foram considerados como os dados da última consulta médica, em geral realizada no mesmo dia, ou no máximo no mesmo mês de inclusão. Para a avaliação antropométrica das crianças foram calculados: Z scores de índice de massa corpórea (IMC) para idade para todos os participantes, Z scores de peso para idade para crianças de 0 a 10 anos (inclusive) e Z scores de estatura para idade para todos os pacientes incluídos. Z scores foram baseados em definições da Organização Mundial de Saúde (OMS) ^{100,101}.

Quando a informação de qualquer data relevante para o estudo estivesse incompleta, foi considerado: se apenas o dado de *ano* (de diagnóstico de HIV, de início de TARV, etc.) era disponível, para fins de análise foi considerada a data de 15 de Julho. Quando apenas *ano* e *mês* eram disponíveis, o dia 15 do mês e ano em questão foram considerados.

O aproveitamento escolar levou em conta as variáveis coletadas *ano escolar atual* e *idade*. De forma análoga à metodologia utilizado pelo sistema educacional brasileiro, foi calculada a adequação entre a série e a idade do aluno, considerando-se os 7 anos como a idade adequada para ingresso no ensino fundamental.

Os dados de contagem de LTCD4+ no diagnóstico de HIV foram considerados como os resultados de LTCD4+ registrados no prontuário médico na data mais próxima da data de diagnóstico do HIV. Os dados de contagem de LTCD4+ no início da TARV foram considerados como a medição de LTCD4+ imediatamente anterior à introdução da TARV. Nos casos em que a TARV foi iniciada logo após o diagnóstico de HIV os mesmos dados de contagem de LTCD4+ entraram em ambas análises (ao diagnóstico do HIV e ao início de TARV). Os dados de contagem de LTCD4+ atual foram considerados como os resultados de LTCD4+ realizados em até seis meses antes da inclusão no estudo.

3.8 Procedimentos do estudo

Todos os participantes tiveram seus dados demográficos e clínicos relevantes para este estudo recolhidos do prontuário médico. A informação coletada pode ser completada durante entrevista com os pais ou responsáveis legais no dia de inclusão no estudo.

A carteira de vacinação de cada participante, quando disponível, foi revisada para obter-se o histórico vacinal para Hepatite B, Hepatite A e vacina tríplice/ tetra viral (número de doses, data da última dose).

Informação acerca do aproveitamento escolar dos pacientes foi coletada através de entrevista com os participantes e/ou responsáveis legais na data da inclusão.

Ainda no dia de inclusão do estudo, para evitar perdas de dados, foi realizada a coleta de amostra de sangue para análise das variáveis de interesse no estudo. Um volume máximo de 17 ml de sangue foi coletado de todos os participantes, respeitando-se os limites recomendados pela OMS de coleta de sangue de 1–5% do volume de sangue total em 24 horas¹⁰². A retirada do sangue foi feita por uma agulha esterilizada descartável, introduzida na veia do braço (procedimento rotineiro). As amostras foram transportadas ao LIM-60 imediatamente após coleta em uma caixa resistente, vedada e a temperatura ambiente, acompanhadas de formulário de identificação das mesmas. As amostras foram congeladas e armazenadas no LIM-60, e posteriormente descongeladas para as análises de citometria de fluxo. Alíquotas de soro foram enviadas ao Laboratório de Imunologia do Hospital Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para realização das sorologias.

3.9 Tamanho amostral

Como tratou-se de um estudo exploratório, não houve cálculo de tamanho amostral prévio ao início do recrutamento, mas foi definida uma meta de incluir aproximadamente 80-100 crianças e adolescentes. Durante o período de recrutamento do estudo foram incluídas 43 crianças no ambulatório do Instituto

Emílio Ribas e 13 crianças no ambulatório do Instituto da Criança do HCFMUSP. Do total de 56 crianças e adolescentes incluídos, 1 foi excluído por não atender a um dos critérios de inclusão (carga viral inferior a 50 cópias/ml no último controle), e não foi portanto incluído nas análises do estudo.

3.10 Análise estatística

- Para as análises dos dados clínicos disponíveis, participantes foram estratificados segundo a idade de início de TARV (<6 meses, ≥6 meses e <1 ano, ≥1 ano e <5 anos ou ≥5anos).
- Para descrever as variáveis contínuas foram calculadas suas médias acompanhadas dos seus intervalos de confiança (IC) de 95% ou suas medianas acompanhadas dos seus intervalos interquartis (percentil 25; percentil 75), o que fosse mais adequado. Também foram obtidos gráficos de pontos e/ou de caixa para a visualização da distribuição das variáveis contínuas.
- Para comparar duas variáveis contínuas foram utilizados o teste *t* de Student, não pareado, bicaudal e ajustado para variâncias desiguais ou o teste de Mann-Whitney bicaudal, o que fosse mais adequado. O teste ANOVA ou Kruskal-Wallis foi utilizado para a comparação de três ou mais grupos e caso o seu resultado fosse estatisticamente significativo foram feitas comparações dois a dois através do teste *t* de Student, não pareado, bicaudal e ajustado para variâncias desiguais ou o teste de Mann-Whitney bicaudal, o que fosse mais adequado. Não foi realizado ajuste para múltiplos testes.
- Para avaliar a correlação entre duas variáveis contínuas foram utilizados os coeficientes de correlação de Pearson ou de Spearman, o que fosse mais adequado. Para visualizar a correlação de variáveis contínuas foram obtidos gráficos de dispersão e *heat maps*.
- Para descrever as variáveis categóricas foram calculadas suas porcentagens e respectivos IC de 95%.

- Para avaliar a associação entre variáveis categóricas foram utilizados o teste do Qui-quadrado ou o teste exato de Fisher, o que fosse mais adequado. Caso o seu resultado fosse estatisticamente significativo em uma comparação que envolvesse mais de dois grupos foram feitas comparações dois a dois através do teste para comparar proporções ou exato de Fisher, o que fosse mais adequado. Não foi realizado ajuste para múltiplos testes.
- O nível α de significância para todos os testes de hipótese foi de 0,05. Todas as análises foram realizadas com Stata 10.1 (StataCorp. 2007. Stata Statistical Software: Release 10. College Station, TX: StataCorp LP).

3.11 Aspectos éticos

Este protocolo de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP (CAPPesq; CAAE 35523414.9.1001.0068) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Infectologia Emilio Ribas (protocolo de pesquisa nº 53/2014). Consentimento informado através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado foi obtido por escrito de pais ou responsáveis das crianças e adolescentes. No caso de crianças ou adolescentes que conheciam seu estado de infecção pelo HIV, foi deles obtido também assentimento, através do Termo de Assentimento aprovado.

3.12 Métodos laboratoriais

3.12.1 Imunofenotipagem

Células mononucleares do sangue periférico, CMSPs (em inglês: *peripheral blood mononuclear cells* - PBMC) foram obtidas a partir das amostras de sangue coletado e criopreservadas em nitrogênio líquido. As CMSPs criopreservadas foram descongeladas rapidamente em banho-maria a 37 °C e transferidas para tubos de 15 ml contendo meio RPMI enriquecido (10% de Soro Fetal Bovino, 2 mM de L-glutamina, 1mM de piruvato de sódio, 1mM de penicilina/estreptomicina, 55µM de 2-Mercaptoetanol, e 10mM da solução de HEPES), estes foram centrifugados a 600g

por 10 minutos, logo após ressuspensas e incubadas com meio R10 com DNase (SIGMA, concentração final de 10µg/ml) por 15 minutos à 37°C, logo após foram contadas em azul de tripan 0,4%. Após a contagem, 1 e 2 x10⁶ de células de cada paciente foram separadas para os painéis de imunofenotipagem (painel I- de ativação, senescência e exaustão celular e o painel II- de células T regs), respectivamente.

As CMSPs foram distribuídas nos respectivos poços da placa de 96 com fundo "V", lavadas com solução de PBS 1x e centrifugadas. Após o descarte do sobrenadante, o pellet de células foi submetido à nova rodada de lavagem e centrifugação, em seguida as células foram ressuspensas e incubadas com o marcador de viabilidade, (LIVE/DEAD® Fixable Cell Stain Kit, Life Technologies), por 15 minutos no escuro e em Temperatura ambiente (TA). Após incubação foram lavadas com MACS (solução de PBS 1x contendo Albumina do soro bovino (0,5%) e EDTA (2mM)) e centrifugadas, o sobrenadante foi desprezado e as células incubadas com os anticorpos monoclonais de superfície referentes ao painel I (Tabela 5) e painel II (Tabela 6), a 4°C por 30 minutos, no escuro.

Tabela 5. Informações dos anticorpos e reagentes utilizados no painel de ativação, senescência e exaustão de LTCD4+ e LTCD8+.

Anticorpo	Clone	Fluorocromo	Marcação
live/dead	-	UV	Superfície 1
CD3	UCHT1	V500	Superfície 2
CD4	SK3	BV650	
CD8	RPA-T8	BUV395	
CD 27	M-T271	PE-CY7	
CD28	CD28.2	APC	
CD 38	HIT2	PerCP Cy 5.5	
CD45 RA	HI100	FITC	
CD57	NK-1	BV 605	
CD95	DX2	BV786	
CD 279 (PD-1)	EH12,2H7	APC-CY7	
CD31	WM59	PE	

CCR7	150503	BV 421	
HLA DR	G46-6	ALEXA700	
CCR5	2D7/CCR5	BV711	Intracelular

Tabela 6. Informações dos anticorpos e reagentes utilizados no painel de células T reguladoras.

Anticorpo	Clone	Fluorocromo	Marcação
live/dead	-	UV	Superfície 1
CD3	UCHT1	ALEXA 700	Superfície 2
CD4	RPA-T4	APC- H7	
CD8	SK1	BV510	
CD25	M-A251	PECF594	
CD127	HIL-7R-M21	APC	
GARP	7B11	PECY7	
FOXP3	259D/C7	PE	Intranuclear
KI-67	B56	FITC	

Após incubação, foram lavadas com MACS, as amostras do painel I foram fixadas com solução de paraformaldeído (PFA) 1% e armazenadas a 4°C, cobertas com alumínio até a aquisição no citômetro.

As amostras do painel II (células Tregs) foram fixadas porém com Tampão A 1x (BD Biosciences), por 10 min, no escuro em temperatura ambiente, após a fixação as células foram centrifugadas a 600g por 5 min, o sobrenadante foi descartado, o pellet de células lavado com MACS e centrifugado. Após o descarte do sobrenadante, as células foram incubadas com Tampão C (o tampão B (50x) diluído 1: 50 no tampão A) em temperatura ambiente, protegidas da luz durante 30 min, para a permeabilização da membrana plasmática e intranuclear. Após esse tempo, a placa foi centrifugada, o sobrenadante descartado e o pellet de células lavado com MACS. Em seguida, procedeu-se a marcação intranuclear com o anticorpo anti-FoxP3, anti-Ki-67 e Tampão MACS durante 1h, em temperatura ambiente. Por fim, as células foram lavadas com MACS e fixadas com PFA a 1%. As células marcadas

e fixadas foram transferidas para microtubos e armazenadas a 4°C, devidamente protegidas da luz, para posterior aquisição em citômetro de fluxo.

As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo BD LSRII Fortessa (Becton Dickinson Immunodiagnostic Systems, San Jose, CA, EUA). A compensação foi realizada com compbeads (positivas- cobertas com anti-Ig-κ e negativas- cobertas com soro fetal bovino- BD Biosciences). Tubos específicos para cada fluorocromo foi preparado contendo uma mistura de compbeads positivas e negativas marcadas com anticorpos conjugados aos fluorocromos específicos a cada tubo.

3.13 Estratégias de análise dos dados de citometria de fluxo

Os dados gerados da aquisição no citômetro de fluxo foram analisados no programa Flowjo (TreeStar, San Carlos, California, USA). A definição dos gates para análise dos painéis com base na análise dos tubos FMO (Fluorescence Minus One), onde foram utilizados tubos de FMO (CD25, CD27, CD28, CD31, CD38, CD45RA, CD57, CD95, CD127, CCR5, CCR7, FoxP3, GARP, HLA-DR, KI-67 e PD-1). A Tabela 7 detalha as moléculas caracterizadas nos painéis de citometria de fluxo assim como as finalidades de sua caracterização neste estudo. A estratégia de análise completa utilizada para os painéis I e II está apresentada na Figura 1.

Tabela 7. Informações descrevendo a função e a finalidade de cada molécula caracterizada através dos painéis de citometria de fluxo*.

Moléculas	Funções	Finalidade no projeto
CD3	Proteína associada ao receptor de células T (TCR); auxilia na transdução de sinais.	Caracterização da população de linfócitos T.
CD4	Proteína que participa da sinalização e adesão celular; co-receptor de MHC de classe II.	Caracterização da população de linfócitos T CD4 auxiliares.
CD8	Proteína que participa da sinalização e adesão celular; co-receptor de MHC de classe I.	Caracterização da população de linfócitos T CD8 citotóxicos.
CD25	Receptor da cadeia α da Interleucina-2 (IL-2).	Ativação celular.
CD27	Proteína ligante do CD70, atua como co-estimulador para ativação de células T e B.	Diferenciação ontogênica.**
CD28	Ativação de células virgens .	Anergia celular (CD28-).

CD31	Molécula de adesão, media interação leucócito-endotélio e endotélio-endotélio	Recém egressa do timo.
CD38	Ectoenzima multifuncional, Glico-hidrolase NAD onde catalisa a nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NAD), participa no processo de adesão celular, transdução de sinais e vias de sinalização.	Ativação celular.
CD39	Ectonucleotidase, enzima envolvida na produção de adenosina.	Ativação celular.
CD45 RA	Isoforma de CD45 contem o exon A, que é uma Tirosina fosfatase que participa do processo de sinalização celular.	Diferenciação ontogênica.**
CD57	Oligossacarídeo encontrado em muitas glicoproteínas de superfície celular, marca perda da capacidade proliferativa celular.	Senescência celular.
CD95	Une-se ao ligantes Fas TNF-similar, induz apoptose.	Apoptose celular.
CD127	Receptor da Interleucina -7 (IL-7), envolvida no processo de proliferação celular.	Caracterização da população de células Tregs.
CCR7 (CD197)	Receptor das quimiocinas CCL19 e CCL21, participando no processo de migração das células para órgãos linfóides secundários.	Diferenciação ontogênica.**
GARP	Glycoprotein A repetitions predominant (GARP)- serve como receptor para TGFbeta latente, ajuda na ação supressora das Treg	Ativação celular.
HLA-DR	Molécula do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe II. Se liga a peptídeos antigênicos de forma estável e apresenta-os na superfície celular.	Ativação celular.
KI-67	Proteína nuclear, associado a proliferação celular, sendo expresso em todos os estágios ativos do ciclo celular.	Proliferação celular.
PD-1	<i>Programmed death-1</i> . Receptor com efeitos inibitórios em linfócitos T, B e monócitos.	Exaustão celular.
FoxP3	(<i>Forkhead box P3</i>)- proteína scurfina, é um fator de transcrição que participa no desenvolvimento e na função das células T reguladoras.	Caracterização da população de células Tregs.
* Adaptado de Janeway, 2002 ¹⁰³ . **A expressão combinada desses marcadores permite classificar os estágios de maturação de uma célula naïve até se desenvolver em uma célula de memória.		

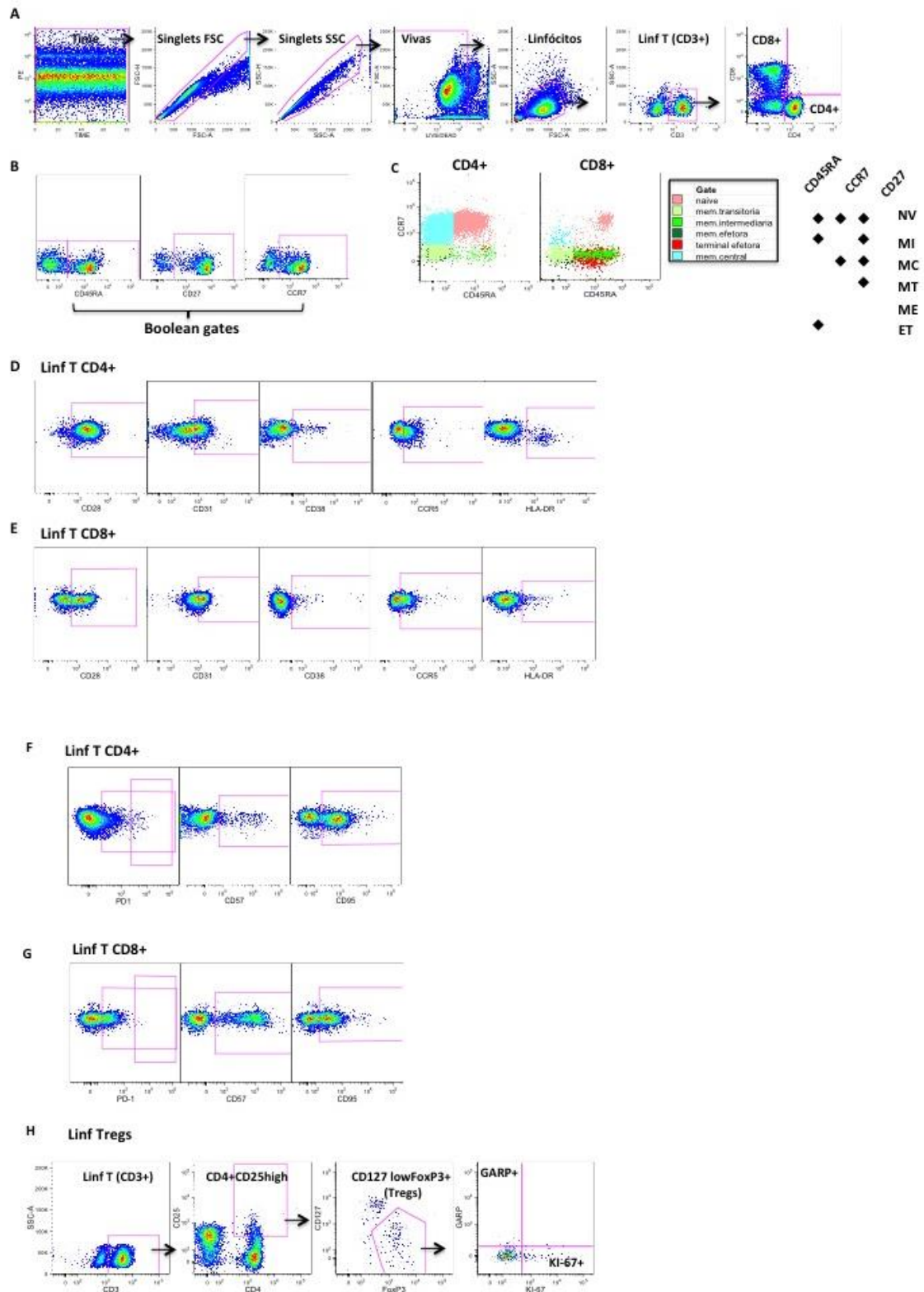


Figura 1. Estratégia de análise de painéis de LTCD4+, LTCD8 + e Treg completa. Os dados foram analisados em gráficos *pseudocolor plot*, seguindo os critérios de qualidade da análise baseados nos seguintes parâmetros: **A)** Time x

PE, para checar o status do laser; FSC-H x FSC-A, Singlets- para excluir células duplicadas; SSC-H x SSC-A, Singlets para excluir células duplicadas; Live/Dead x FSC-A, para excluir as células mortas; FSC-A x SSC-A, para identificar a população de linfócitos; CD3 x SSC-A, para linfócitos T; CD4 x CD8 para identificar as subpopulações de linfócitos T CD4+ e CD8+; **B)** Com base no FMO, os *gates* foram definidos para a identificação da expressão de CD45RA, CD27 e CCR7, através da combinação booleana desses marcadores foi identificado seis diferentes subpopulações (naïve/ memória das células); **C)** Gráficos *dot plots* representando as seis diferentes subpopulações de naïve/memória encontradas dentro das populações totais de CD4+ e CD8+: *Naive* -NV (CD45RA+CD27+CCR7+); Memória Central- MC (CD45RA-CD27+CCR7+), Memória Transitória-MT (CD45RA-CD27+CCR7-); Memória Intermediária-MI (CD45RA+CD27+CCR7-); Memória Efetora- ME (CD45RA-CD27-CCR7-); e Efetora Terminal-ET (CD45RA+CD27-CCR7-). Os gráficos **F** e **G** representam o perfil de expressão dos marcadores de exaustão (PD-1 e CD95) e senescência (CD57) nas populações de células T CD4+ e CD8+ respectivamente. A figura **H** é a representação da caracterização de células T reguladoras, onde utilizamos uma sequência de gráficos contendo os critérios de qualidade como na figura anterior de expressão de marcadores de ativação, exaustão e senescência (Time, singlets fsc, singlets ssc, viabilidade e por fim a definição de linfócitos), e os de identificação e caracterização, seguido nesta figura pelo gráfico dot plot de caracterização da população de linfócitos T (CD3 X SSC), seguido de CD4+ e expressão alta de CD25, baixa ou nenhuma expressão de CD127 e FoxP3+ identificamos como células T reguladoras; as proteínas KI-67 e GARP foram analisadas tanto na população total de células T CD4+ e CD8+ com na de Treg também.

3.14 Resposta vacinal

Anticorpos produzidos como resposta vacinal foram pesquisados no soro das amostras de sangue coletadas.

Para determinação de anticorpos contra o antígeno de superfície do vírus da Hepatite B (anti – HBs) e anticorpos totais contra a Hepatite A (anti-HAV - IgM e IgG) foi realizada pesquisa através do método de eletroquimioluminescência na

plataforma COBAS 8000 da ROCHE. Para a Hepatite B são consideradas reagentes as amostras com títulos de valor igual ou superior a 10 UI/L, e não reagentes se inferiores a 10 UI/L. Para a Hepatite A são consideradas reagentes as amostras com títulos de valor igual ou superior a 20 UI/L, e não reagentes se inferiores a 20 UI/L.

Para medição de anticorpos IgG contra Caxumba e IgG contra Rubéola foi realizada pesquisa através do método de eletroquimioluminescência no equipamento Liaison da DiaSorin. Para a Rubéola são consideradas reagentes as amostras com títulos de valor igual ou superior a 10 UI/mL e não reagentes se títulos inferiores a 10 UI/mL. Para a Caxumba o resultado é considerado reagente se títulos de valor igual ou superior a 11,0 UA/ml, inconclusivo se amostras com títulos de valor igual ou superior a 9,0 e inferiores a 11 UA/ml, e não reagente se títulos inferiores a 9,0 UA/ml. Neste estudo os resultados inconclusivos foram somados aos não reagentes.

4. Resultados

De abril de 2016 a junho de 2017, 43 crianças e adolescentes em seguimento no ambulatório de Infectologia Pediátrica do Instituto de Infectologia do Emílio Ribas, e 13 crianças atendidas no ambulatório de Infectologia Pediátrica do Instituto da Criança da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo tinham sido incluídos no estudo. Destas, 1 foi posteriormente excluída por apresentarem carga viral superior a 50 cópias/ml na data da inclusão no estudo, não preenchendo portanto um de seus critérios de inclusão.

4.1 Dados demográficos

À inclusão no estudo, a média de idade dos pacientes incluídos no estudo era de 12 anos, 64% eram do sexo masculino, 48% eram de etnia parda/morena, 44% de etnia branca, e 9% de etnia negra. Entre as crianças frequentando escola (n=45), 69% estavam cursando o ensino fundamental e 31% o ensino médio. As demais crianças não frequentavam escola por idade inferior a 7 anos ou por apresentar comprometimento cognitivo importante que impossibilitasse a educação formal. Quanto ao aproveitamento escolar, 14 (31%) dos pacientes frequentando escola haviam repetido de ano pelo menos uma vez. Entre as crianças e adolescentes que tiveram seu índice de adequação idade/ano escolar calculado (n=45), 39 (45%) foram considerados como adequados. 14 participantes (25%) eram institucionalizados. Para os demais (n=41) foi perguntada a escolaridade da mãe ou cuidador principal: 12% não chegaram a completar o ensino fundamental, 29% tinham o fundamental completo, 7% tinham o ensino médio incompleto, 22% o ensino médio completo, 2% tinham o ensino superior incompleto, e 27% o ensino superior completo. Quando da presença de um segundo cuidador principal (n=26), 4% tinham ensino fundamental incompleto, 27% tinham fundamental completo, 11% tinham o ensino médio incompleto, 19% tinham o médio completo, 8% tinham ensino superior incompleto e 31% tinham o superior completo. Apenas 1 participante realizava trabalho remunerado. A Tabela 8 descreve os dados demográficos dos participantes à entrada no estudo.

Tabela 8. Dados demográficos dos participantes na inclusão no estudo.

Dados demográficos dos pacientes na inclusão do estudo	n	*
Sexo (N=55)		
Homens (%)	35	63,6 (49,6–76,2)
Idade (anos) (N=55)		12,0 (10,8–13,2)
Etnia (%) (N=55)		
Branca	24	43,6 (30,3–57,7)
Morena ou Parda	26	47,3 (33,7–61,2)
Negra	5	9,1 (3,0–20,0)
Escolaridade (%) (N=55)		
Ensino Fundamental	31	56,4 (42,3–69,7)
Ensino Médio	14	25,5 (14,7–39,0)
Não frequenta escola	10	18,2 (9,1–30,9)
Distorção Idade-Série Escolar (%) (N=45)	6	13,3 (5,1–26,8)
Escolaridade Mãe (%) (N=41)		
Fundamental Completo	12	29,3 (16,1–45,5)
Fundamental Incompleto	5	12,2 (4,1–26,2)
Médio Completo	9	22,0 (10,6–37,6)
Médio Incompleto	3	7,3 (1,5–19,9)
Superior Completo	11	26,8 (14,2–42,9)
Superior Incompleto	1	2,4 (0,1–12,9)
Escolaridade Pai (%) (N=26)		
Fundamental Completo	7	26,9 (11,6–47,8)

Tabela 8. Dados demográficos dos participantes na inclusão no estudo (continuação).

Fundamental Incompleto	1	3,8 (0,1–19,6)
Médio Completo	5	19,2 (6,6–39,4)
Médio Incompleto	3	11,5 (2,4–30,2)
Superior Completo	8	30,8 (14,3–51,8)
Superior Incompleto	2	7,7 (0,9–25,1)
*% (IC 95%) ou média (IC 95%)		

4.2 Diagnóstico do HIV e início de terapia antirretroviral

Dados do diagnóstico do HIV eram frequentemente incompletos à revisão dos prontuários médicos. A mediana de idade ao diagnóstico da infecção pelo HIV foi de 0,7 anos (p25=0,3; p75=2,2). Contagens de LTCD4+ total estavam disponíveis para 38 (70%) pacientes e a média de CD4 total para este subgrupo foi de 1590 células/ mm³. Porcentagens de LTCD4+ estavam disponíveis para 25 (45%) pacientes, e a média foi de 26,8%. 46% dos pacientes não apresentavam imunossupressão segundo os critérios definidos pelo *Centers for Diseases Control and Prevention* (CDC) de imunossupressão de acordo com contagem total e percentual de LTCD4+, enquanto que 32% apresentavam imunossupressão moderada e 16% grave. Contagens de carga viral do HIV estavam disponíveis para 40 (73%) pacientes e a mediana foi de 501.187 cópias/ml (em log₁₀ cópias/ml= 5,7). A Tabela 9 detalha as características dos pacientes incluídos no estudo no momento do diagnóstico da infecção pelo HIV.

Tabela 9. Características dos pacientes no momento do diagnóstico da infecção pelo HIV.

Características dos pacientes	n	*
Idade (anos) (N=54)		0,7 (0,3;2,2)
LTCD4 no diagnóstico HIV (cel/mm ³) (N=38)		1590,5 (1242,3–1938,6)
LTCD4 no diagnóstico HIV (%) (N=25)		26,8 (21,5–32,1)
Alteração LTCD4 (% ou Contagem) (%) (N=41)		
Ausente	19	46,3 (30,7–62,6)
Moderada	12	29,3 (16,1–45,5)
Grave	10	24,4 (12,4–40,3)
CV no diagnóstico HIV log ₁₀ (cópias/ml) (N=40)		5,7 (5,1;5,9)
*% (IC 95%) ou média (IC 95%) ou mediana (p25;p75).		

A mediana de idade ao início da terapia antirretroviral foi de 1,8 anos (p25=0,6; p75=3,6). Contagens de LTCD4+ total estavam disponíveis para 35 (64%) pacientes e a média de CD4 total para este subgrupo foi de 1260 células/ mm³. Porcentagens de LTCD4+ estavam disponíveis para 31 (56%) pacientes, e a média foi de 25,5%. 31% dos pacientes não apresentavam imunossupressão segundo os critérios definidos pelo CDC, enquanto que 40% apresentavam imunossupressão moderada e 29% grave. Contagens de carga viral do HIV estavam disponíveis para 42 (76%) pacientes e a mediana foi de 316.228 cópias/ml (em log₁₀ cópias/ml= 5,5). Metade (53%) das crianças foram iniciadas em esquema de triterapia com dois medicamentos inibidores nucleosídeos da transcriptase reversa (INTR) e um inibidores não nucleosídeos da transcriptase reversa (INNTR), enquanto que 27% iniciaram TARV com dois INTR e um medicamento inibidor de protease (IP), 18% iniciaram terapia dupla, e 2% triterapia com três INTR. A Tabela 10 detalha as características dos pacientes incluídos no estudo no momento de início da terapia antirretroviral. Dados de peso e estatura no momento do diagnóstico da infecção do HIV e no início da TARV não estavam disponíveis para a maioria dos pacientes e portanto não foram incluídos nas análises.

Tabela 10. Características dos pacientes ao início da TARV.

Características dos pacientes	n	*
Idade (anos) (N=54)		1,8 (0,6;3,6)
LTCD4 (cel/mm ³) (N=35)		1260,4 (940,7–1580,0)
LTCD4 (%) (N=31)		25,5 (20,6–30,4)
Alteração LTCD4 (% ou Contagem) (%) (N=36)		
Ausente	11	31,4 (16,9–49,3)
Moderada	14	40,0 (23,9–57,9)
Grave	10	28,6 (14,6–46,3)
CV log ₁₀ (cópias/ml) (N=42)		5,5 (5,0;5,7)
TARV (%) (N=51)		
2 INTR+IP	14	27,5
2 INTR+1 INNTR	27	53,0
Dupla Terapia	9	17,7
3 INTR	1	2,0
*% (IC 95%) ou média (IC 95%) ou mediana (p25;p75) ou %.		

4.3 Progressão da doença pelo HIV e idade de início da terapia antirretroviral

A Tabela 11 detalha as características dos pacientes inclusive quanto à progressão da doença pelo HIV no que tange principalmente ao histórico de contagens e percentuais de LTCD4+ e terapia antirretroviral avaliadas retrospectivamente até o momento da inclusão no estudo. Na inclusão no estudo os pacientes tinham uma média de 9 anos de terapia antirretroviral e em vinham mantendo carga viral inferior a 50 cópias/ml em média há 5 anos. No grupo como um todo o intervalo mediano entre o diagnóstico da infecção pelo HIV e o início da terapia antirretroviral era de 3 meses, porém eram dignos de nota intervalos maiores encontrados na amostra (P25=0,8; P75=21,1). 16% dos pacientes tinham histórico de interrupção da TARV em algum momento desde o início da terapia, e 80% já tinham feito ao menos uma troca de esquema de antirretrovirais. Do total de participantes, 60% tinham documentada ao menos uma infecção oportunista e a enorme maioria (93%) tinha sido hospitalizada ao menos uma vez. O grupo tinha uma mediana de

CD4 nadir total de 572 células/mm³ e percentual mediano de 26%, alcançado numa idade média de 7 anos. Quando classificados segundo os critérios definidos pelo *Centers for Diseases Control and Prevention* (CDC) de imunossupressão de acordo com contagem e percentual de LTCD4+ nadir, 40% dos pacientes tinham experimentado imunossupressão moderada e 32% grave em algum momento do seu histórico, enquanto que 28% deles não tiveram documentado nenhum grau de imunossupressão. Na inclusão a contagem mediana de LTCD4+ era de 1010 cel/mm³ e o percentual de LTCD4+ mediano era de 37%. 96% dos pacientes apresentavam contagem e percentual de LTCD4+ normais para a faixa etária no momento da inclusão segundo os critérios do CDC. A Figura 2 detalha a evolução dos valores absolutos e percentuais de LTCD4+ das crianças incluídas no estudo, no momento do diagnóstico da infecção pelo HIV, no início da TARV e na inclusão no estudo. Digno de nota, visualiza-se o aumento do percentual de LCTD4+ do grupo entre o momento de início da TARV e a inclusão no estudo. Para o grupo de todos os pacientes incluídos, a razão média de LTCD4+/LTCD8+ era de 1,6. Quanto à terapia antirretroviral no momento da inclusão, 55% dos pacientes faziam uso de dois inibidores nucleosídeos da transcriptase reversa e um inibidor de protease, 31% estavam em uso de dois inibidores nucleosídeos da transcriptase reversa e um inibidor não nucleosídeo, 9% estava em uso de esquema que incluía um inibidor da integrase, e 5% estavam em uso de outras combinações de medicamentos antirretrovirais. Quanto à avaliação antropométrica das crianças incluídas, na avaliação do índice IMC/idade, apenas quatro crianças encontravam-se fora dos limites da eutrofia, sendo que duas delas apresentavam-se a mais de -2DP no sentido de baixo IMC para idade, e as duas outras com IMC/idade acima dos dois DP no sentido da obesidade (+2DP), o restante das crianças sendo classificado como eutrófico. Entre as crianças avaliadas através do índice Peso/Idade, sendo estas as crianças até 10 anos de idade (inclusive) no momento da inclusão, o grupo apresentou-se dentro da faixa de peso adequado para a idade, porém com a mediana desviada em direção a peso baixo para a idade (Z score -0,6), com exceção de uma criança que apresentou-se dentro da faixa de baixo peso para a idade, ou *wasting* (Z score < 2DP). Já na avaliação do índice estatura/idade, o grupo encontrou-se dentro da faixa de estatura adequada para a idade porém 1 DP abaixo da mediana para a idade. Além disso 9 crianças encontravam-se abaixo dos 2 DP da mediana, denotando baixa estatura para a idade (*stunting*).

Tabela 11. Características dos pacientes na inclusão no estudo.

Características dos pacientes	n	*
Tempo entre diagnóstico e início TARV (meses) (N=53)		3,4 (0,8;21,1)
Tempo de TARV (anos) (N=54)		8,9 (7,7–10,1)
Tempo carga viral < 50 cópias/ml (anos) (N=54)		4,8 (4,0–5,5)
Troca de esquema ARV (%) (N=51)		80,4 (66,9–90,2)
Interrupção TARV (%) (N=55)		16,4 (7,8–28,8)
Hospitalização prévia (%) (N=55)		92,7 (82,4–98,0)
Infecção oportunista (%) (N=50)		60,0 (45,2–73,6)
LTCD4 (cel/mm ³) (N=54)		1010,0 (746,0;1275,0)
LTCD4 (%) (N=54)		36,7 (32,0;39,9)
LTCD4/LTCD8 (%) (N=43)		1,6 (1,3–1,8)
Alteração LTCD4 Inclusão (% ou Contagem) (%) (N=54)		
Ausente	52	96,3 (87,3–99,5)
Moderada	2	3,7 (0,5–12,7)
Grave	0	
Idade Nadir LTCD4 (anos) (N=53)		7,2 (5,9–8,5)
LTCD4 Nadir (cel/mm ³) (N=53)		572,0 (369,0;789,0)
LTCD4 Nadir (%) (N=49)		26,0 (19,0;34,0)

Tabela 11. Características dos pacientes na inclusão no estudo (continuação).

Alteração CD4 Nadir (% ou Contagem) (%) (N=53)		
Ausente	15	28,3 (16,8–42,3)
Moderada	21	39,6 (26,5–54,0)
Grave	17	32,1 (19,9–46,3)
TARV (%) (N=55)		
2 INTR+IP	30	54,5
2 INTR+1 INNTR	17	30,9
Esquema com Inibidor de Integrase	5	9,1
Outros	3	5,5
Peso (kg) (N=54)		38,6 (33,8–43,4)
Estatura (cm) (N=52)		140,1 (133,4–146,8)
IMC (kg/m²) (N=52)		18,6 (17,5–19,8)
IMC/Idade (Score z) (N=52)		0,0 (-0,3–0,3)
>2 (%)	2	3,8 (0,5–13,2)
<-2 (%)	2	3,8 (0,5–13,2)
Estatura/Idade (Score z) (N=52)		-1,0 (-1,3--0,7)
<-2 (%)	9	17,3 (8,2–30,3)
Peso/Idade (Score z) (N=20)		-0,6 (-1,0--0,2)
>2 (%)	0	0,0 (0,0–16,8)
<-2 (%)	1	5,0 (0,1–24,9)
*% (IC 95%) ou média (IC 95%) ou mediana (p25;p75) ou %.		

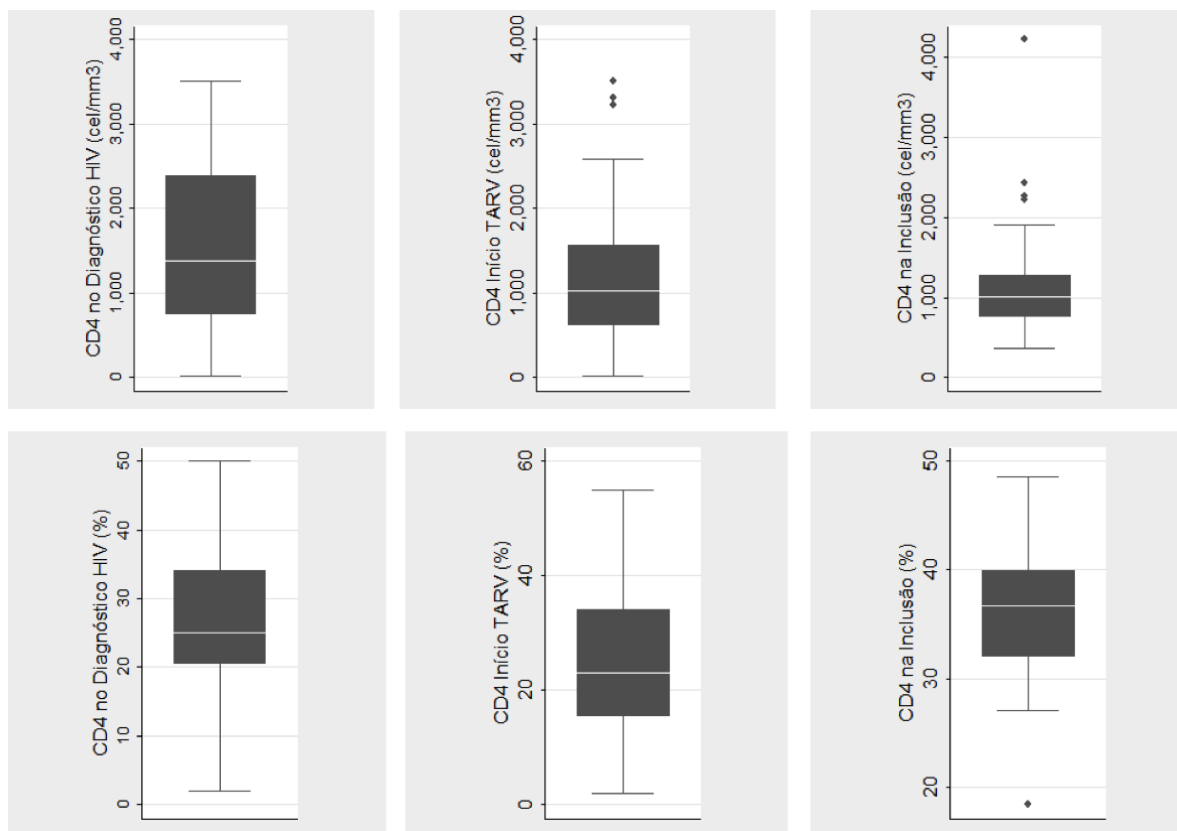


Figura 2. Valores absolutos e percentuais de LTCD4+ das crianças incluídas no estudo, ao diagnóstico de infecção de HIV, ao início da TARV e no momento de inclusão no estudo.

Com o objetivo de explorar a relação entre a idade de início da TARV e os diversos desfechos de progressão da doença, pacientes foram estratificados quanto à idade de início da terapia antirretroviral nos seguintes grupos: pacientes que iniciaram TARV antes dos seis meses completos de idade, de seis meses até um ano de idade incompleto, idade entre 1 ano e menor de 5 anos, e idade igual ou superior a 5 anos. Suas características no momento do diagnóstico da infecção pelo HIV assim como no início da terapia antirretroviral estão resumidas na Tabela 12. Quando examinados valores absolutos e percentuais de LTCD4+ e valores de carga viral em ambos momentos (ao diagnóstico do HIV e ao início da TARV), não foram encontradas diferenças estatisticamente significante entre os grupos, ou seja, os grupos iniciando TARV em idades diferentes foram diagnosticados pelo HIV e iniciados em TARV em situações semelhantes de progressão da doença, no que tange às contagens e percentuais de LTCD4+ e correspondente classificação quanto ao grau de

imunossupressão. Quanto à carga viral, pacientes iniciando TARV mais precocemente apresentavam contagens de carga viral mais altas, conforme esperado, já que crianças infectadas pelo HIV perinatalmente apresentam cargas virais mais altas em idades mais precoces se comparadas às cargas virais que irão apresentar mais tarde. Digno de nota, observou-se que no grupo iniciando TARV após os 5 anos de idade a mediana de idade de início da terapia foi de aproximadamente 10 anos, indicando que possivelmente este grupo incluía crianças infectadas pelo HIV com progressão lenta da doença.

Tabela 12. Características dos pacientes ao diagnóstico da infecção pelo HIV e no início da TARV, estratificados pela idade de início da TARV.

Idade de início de TARV	<6 meses		≥6 meses e < 1 ano		≥ 1 ano e < 5 anos		≥ 5 anos		
Diagnóstico da infecção pelo HIV	N	*	N	*	N	*	N	*	p†
Idade (anos)	11	0,2 (0,1;0,3)	10	0,6 (0,5;0,8)	22	1,2 (0,6;2,3)	11	2,0 (0,2;5,7)	<0,001^a
LTCD4 (cel/mm³)	7	1359,0 (805,0;2494,0)	8	2115,5 (908,0;3143,5)	15	1302,0 (706,0;2200,0)	8	1507,0 (684,5;2223,5)	0,767
LTCD4 (%)	4	35,9 (18,3;44,6)	9	25,0 (22,0;34,2)	7	23,9 (18,0;30,0)	5	23,0 (20,4;26,2)	0,781
Alteração CD4 Mod/Grave (% ou total) (%)	7	57,1 (18,4;90,1)	9	44,4 (13,7;78,8)	17	58,8 (32,9;81,6)	8	50,0 (15,7;84,3)	0,969
CV log₁₀(cópias/ml)	9	5,9 (5,6;5,9)	9	5,7 (5,7;6,3)	14	5,5 (5,1;5,7)	8	5,1 (4,1;5,7)	0,066
Início da TARV	N	*	N	*	N	*	N	*	p†
Idade (anos)	12	0,4 (0,2;0,4)	10	0,8 (0,6;0,9)	21	3,0 (2,4;3,3)	11	9,8 (6,6;11,2)	
LTCD4 (cel/mm³)	6	1458,5 (1029,0;2494,0)	7	1391,0 (435,0;2579,0)	14	967,5 (693,0;1485,0)	8	623,5 (282,5;947,0)	0,052
LTCD4 (%)	4	35,9 (18,3;44,6)	7	24,2 (20,0;42,5)	13	22,0 (15,3;24,7)	7	24,9 (14,8;34,0)	0,575
Alteração LTCD4 Mod/Grave (% ou total) (%)	6	50,0 (11,8;88,2)	7	57,1 (18,4;90,1)	14	85,7 (57,2;98,2)	8	62,5 (24,5;91,5)	0,338
CV log₁₀(cópias/ml)	9	5,7 (5,6;5,9)	10	5,7 (5,3;6,3)	15	5,3 (5,1;5,7)	8	4,6 (4,0;4,8)	0,002^b
*p50 (p25;p75) ou % (IC 95%)†Teste de Kruskal-Wallis ou Exato de Fisher. a <6m x 6m-1a (p=0), <6m x 1-5a (p=0), <6m x ≥5a (p=0,023), 6m-1a x 1-5a (p=0,022); b <6m x ≥5a (p=0,001), 6m-1a x ≥5a(p=0,003), 1-5a x ≥5a(p=0,003). Teste de Mann-Whitney bicaudal ou exato de Fisher.									

No momento da inclusão do estudo, porém, algumas diferenças puderam ser destacadas entre os grupos (Tabela 13). Os grupos estratificados por idade de início de TARV não tem diferenças quanto ao tempo de carga viral inferior a 50 cópias/ml, à ocorrência de interrupção de TARV ou troca de terapia antirretroviral, à história de infecções oportunistas ou hospitalização prévia, aos índices antropométricos, ao índice de distorção escolar, e finalmente, à situação imunológica atual (grau de imunossupressão de acordo com total e % de LTCD4+). Na análise das variáveis no momento da inclusão no estudo nos grupos estratificados conforme a idade de início de TARV, crianças iniciando TARV antes dos 6 meses apresentaram níveis de LTCD4+ absolutos maiores quando comparadas às crianças que iniciaram TARV entre 1-5 anos ($p=0,014$) e após os 5 anos ($p=0,023$); o mesmo não foi visto quando examinado o percentual de LTCD4+. Além disso crianças iniciando TARV antes dos 6 meses apresentaram maior relação LTCD4+/LTCD8+ (%) em comparação àquelas iniciando TARV entre 1-5 anos ($p=0,027$) e após os 5 anos ($p=0,001$), contagens de LTCD4+ nadir absoluto mais altas do que naquelas iniciando TARV entre 1-5 anos ($p=0,001$) e após os 5 anos ($p=0,035$); o mesmo não foi visto quando examinado o percentual de nadir LTCD4+; LTCD4+ (%) nadir indicando alteração imune moderada/grave menos frequente em comparação com aquelas iniciando TARV entre 1-5 anos ($p=0,008$) e após os 5 anos ($p=0,017$); o mesmo não foi observado quando analisadas as contagens de LTCD4+ nadir que indicassem alteração imune moderada/grave (Figura 3).

Tabela 13. Características dos pacientes na inclusão no estudo, estratificados pela idade de início da TARV.

Idade de início de TARV	<6 meses		≥6 meses e < 1 ano		≥ 1 ano e < 5 anos		≥ 5 anos		
<i>Características dos participantes na inclusão no estudo</i>	N	*	N	*	N	*	N	*	p†
Idade (anos)	12	8,4 (5,6;10,7)	10	9,1 (5,6;15,1)	22	14,9 (11,5;16,5)	11	15,2 (12,1;15,9)	0,022^a
Etnia Branca (%)	12	33,3 (9,9–65,1)	10	70,0 (34,8–93,3)	22	31,8 (13,9–54,9)	11	54,5 (23,4–83,3)	0,171
Distorção Idade-Série Escolar (%)	7	14,3 (0,4–57,9)	7	14,3 (0,4–57,9)	20	5,0 (0,1–24,9)	11	27,3 (6,0–61,0)	0,267
Tempo entre diagnóstico e início TARV (meses)	11	0,8 (0,0;2,8)	10	0,7 (0,2;2,8)	21	6,5 (3,0;24,8)	11	71,1 (10,9;133,9)	<0,001^b
Tempo de TARV (anos)	12	8,0 (5,3;10,5)	10	8,4 (4,9;14,2)	21	12,5 (9,2;13,6)	11	4,7 (2,3;7,7)	0,002^c
Tempo carga viral indetectável (anos)	12	4,0 (2,6;7,1)	10	4,3 (2,2;8,0)	21	5,7 (2,8;8,1)	11	3,1 (1,8;6,3)	0,507
Troca de esquema ARV (%)	11	63,6 (30,8–89,1)	9	66,7 (29,9–92,5)	20	95,0 (75,1–99,9)	11	81,8 (48,2–97,7)	0,076
Interrupção TARV (%)	12	16,7 (2,1–48,4)	10	10,0 (0,3–44,5)	22	18,2 (5,2–40,3)	11	18,2 (2,3–51,8)	1
Hospitalização prévia (%)	12	100,0 (73,5–100,0)	10	100,0 (69,2–100,0)	22	81,8 (59,7–94,8)	11	100,0 (71,5–100,0)	0,174
Infecção oportunista (%)	11	72,7 (39,0–94,0)	9	44,4 (13,7–78,8)	20	65,0 (40,8–84,6)	10	50,0 (18,7–81,3)	0,531
LTCD4 (cel/mm³)	12	1292,5 (1076,5;1556,0)	9	1151,0 (834,0;1557,0)	22	846,5 (685,0;1182,0)	11	875,0 (644,0;1026,0)	0,02^d

Tabela 13. Características dos pacientes na inclusão no estudo, estratificados pela idade de início da TARV (continuação).

<i>Características dos participantes na inclusão no estudo</i>	N	*	N	*	N	*	N	*	p†
LTCD4 (%)	12	38,9 (37,2;40,9)	9	37,0 (33,0;40,1)	22	33,5 (31,1;37,0)	11	34,0 (30,0;39,9)	0,132
LTCD4/LTCD8 (%)	10	1,7 (1,6;1,8)	8	1,7 (1,1;2,9)	15	1,3 (1,1;1,5)	10	1,2 (1,1;1,2)	0,009^e
Alteração LTCD4 Nadir Mod/Grave (Contagem) (%)	11	54,5 (23,4–83,3)	9	55,6 (21,2–86,3)	22	77,3 (54,6–92,2)	11	54,5 (23,4–83,3)	0,397
Alteração LTCD4 Nadir Moderada/Grave (%) (%)	10	0,0(0,0–30,8)	10	33,3(7,5–70,1)	19	63,2(38,4–83,7)	11	45,5(16,7–76,6)	0,006^f
Idade Nadir LTCD4 (Anos)	11	5,8 (0,9;9,8)	9	5,7 (0,8;10,5)	22	5,5 (3,6;10,6)	11	10,0 (7,5;13,0)	0,067
LTCD4 Nadir (cel/mm ³)	11	791,0 (499,0;1449,0)	9	566,0 (435,0;895,0)	22	515,0 (345,0;742,0)	11	490,0 (269,0;634,0)	0,042^g
LTCD4 Nadir (%)	10	31,5 (29,0;39,0)	9	25,0 (20,0;34,0)	19	21,0 (16,0;33,0)	11	26,0 (18,0;36,0)	0,06
Alteração LTCD4 Nadir Mod/Grave (% ou contagem) (%)	11	54,5 (23,4;83,3)	9	66,7 (29,9;92,5)	22	81,8 (59,7;94,8)	11	72,7 (39,0;94,0)	0,398

Tabela 13. Características dos pacientes na inclusão no estudo, estratificados pela idade de início da TARV (continuação).

Alteração LTCD4 na Inclusão Mod/Grave (% ou contagem) (%)	12	0,0 (0,0;26,5)	9	0,0 (0,0;33,6)	22	4,5 (0,1;22,8)	11	9,1 (0,2;41,3)	0,816
IMC/Idade (Score z)	11	0,3 (-0,4;0,6)	10	-0,1 (-0,4;0,2)	20	-0,2 (-1,1;0,8)	11	-0,0 (-0,5;1,3)	0,634
>2 (%)	11	0,0 (0,0–28,5)	10	0,0 (0,0–30,8)	20	5,0 (0,1–24,9)	11	9,1 (0,2–41,3)	1
<-2 (%)	11	9,1 (0,2–41,3)	10	0,0 (0,0–30,8)	20	5,0 (0,1–24,9)	11	0,0 (0,0–28,5)	1
Estatutura/Idade (Score z)	11	-1,3 (-2,5;-0,6)	10	-0,3 (-1,4;0,2)	20	-0,9 (-1,6;-0,3)	11	-1,4 (-2,0;-0,6)	0,206
<-2 (%)	11	27,3 (6,0–61,0)	10	0,0 (0,0–30,8)	20	20,0 (5,7–43,7)	11	18,2 (2,3–51,8)	0,453
Peso/Idade (Score z)	8	-0,5 (-1,1;-0,3)	6	-0,2 (-1,0;0,2)	4	-0,1 (-0,5;0,3)	2	-2,1 (-2,5;-1,6)	0,078
>2 (%)	8	0,0 (0,0–36,9)	6	0,0 (0,0–45,9)	4	0,0 (0,0–60,2)	2	0,0 (0,0–84,2)	
<-2 (%)	8	0,0 (0,0–36,9)	6	0,0 (0,0–45,9)	4	0,0 (0,0–60,2)	2	50,0 (1,3–98,7)	0,1
*p50 (p25;p75) ou % (IC 95%)†Teste de Kruskal-Wallis ou Exato de Fisher.									
^a <6m x 1-5a (p=0,014), <6m x ≥5a (p=0,023), 6m-1a x 1-5a (p=0,042); ^b <6m x 1-5a(p=0,001), <6m x ≥5a(p=0,001), 6m-1a x 1-5a(p=0,003), 6m-1a x ≥5a(p=0,001), 1-5a x ≥5a(p=0,001); ^c <6m x ≥5a (p=0,036), 6m-1a x ≥5a(p=0,035), 1-5a x ≥5a(p=0,035); ^d <6m x 1-5a (p=0,014), <6m x ≥5a(p=0,023); ^e <6m x 1-5a (p=0,027), <6m x ≥5a(p=0,001); ^f <6m x 1-5a (p=0,008), <6m x ≥5a(p=0,017); ^g <6m x 1-5a (p=0,001), <6m x ≥5a(p=0,035). Teste de Kruskal-Wallis ou Exato de Fisher									

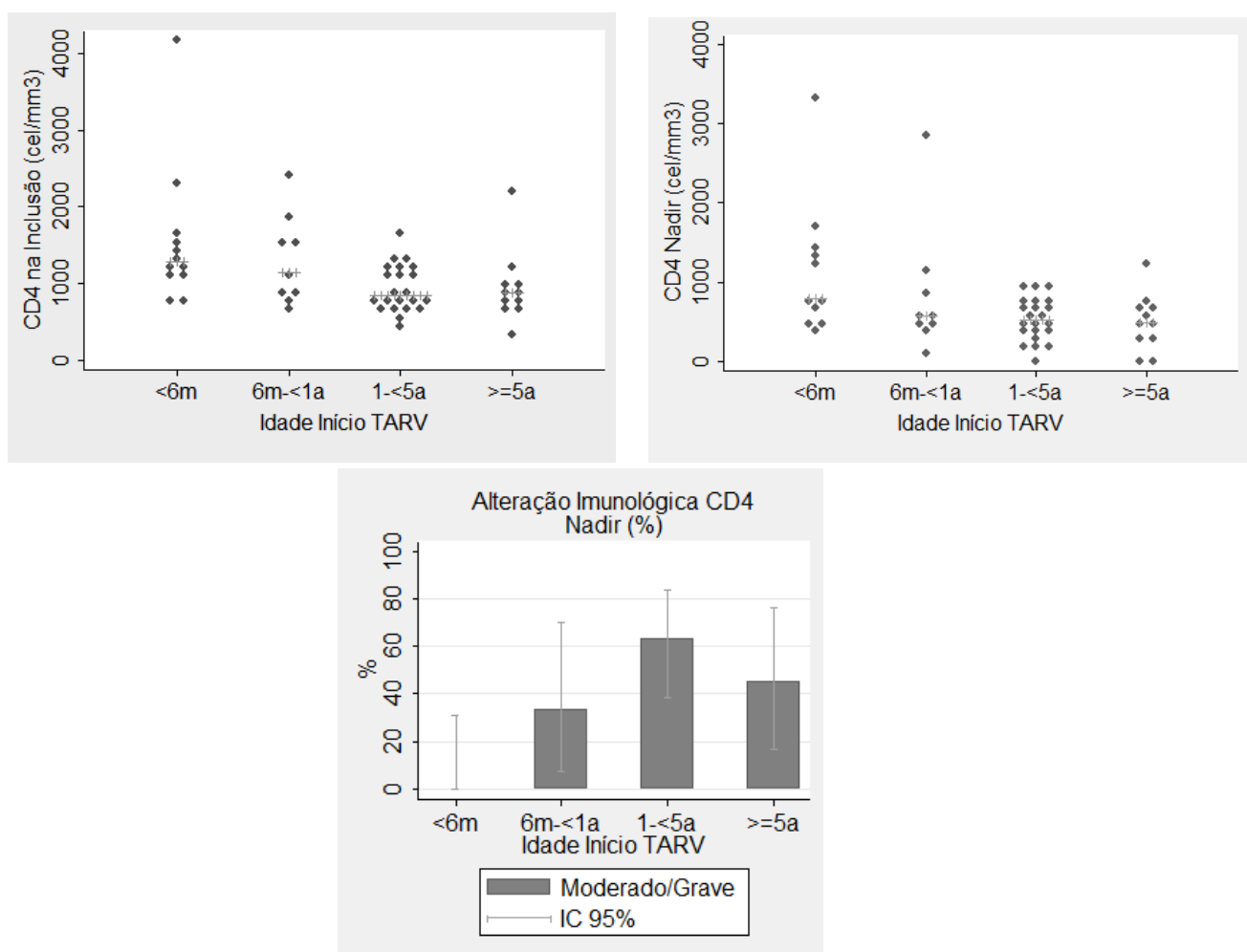


Figura 3. Contagens de LTCD4+ (absoluto) e razão LTCD4+/LTCD8+ na inclusão no estudo, e contagens de LTCD4+ (absoluto) Nadir e classificação de alteração de Nadir LTCD4+, das crianças estratificadas pela idade ao início da TARV.

De maneira análoga, quando examinadas as variáveis de forma contínua e verificadas suas correlações com a idade de início da TARV, esta se correlaciona de maneira negativa com níveis de LTCD4+ absolutos e percentuais (%) na inclusão mais altos, valores de nadir LTCD4+ absolutos e percentuais (%) mais altos, e razão LTCD4+/LTCD8+ mais alta na inclusão, ou seja, preservando níveis de LTCD4+ (Tabela 14 e Figura 4).

Tabela 14. Correlação da idade de início de TARV e características dos participantes na inclusão do estudo.

Na inclusão do estudo	N	rho*	p*
CD4 (cel/mm3)	53	-0,41	0,003
CD4 (%)	53	-0,32	0,018
CD4/CD8 (%)	42	-0,54	<0,001
CD4 Nadir (cel/mm3)	52	-0,39	0,004
CD4 Nadir (%)	48	-0,32	0,028
IMC/Idade (Score z)	51	-0,08	0,587
Estatura/Idade (Score z)	51	0,03	0,852
Peso/Idade (Score z)	20	0,11	0,654
*Correlação de Spearman, teste bicaudal.			

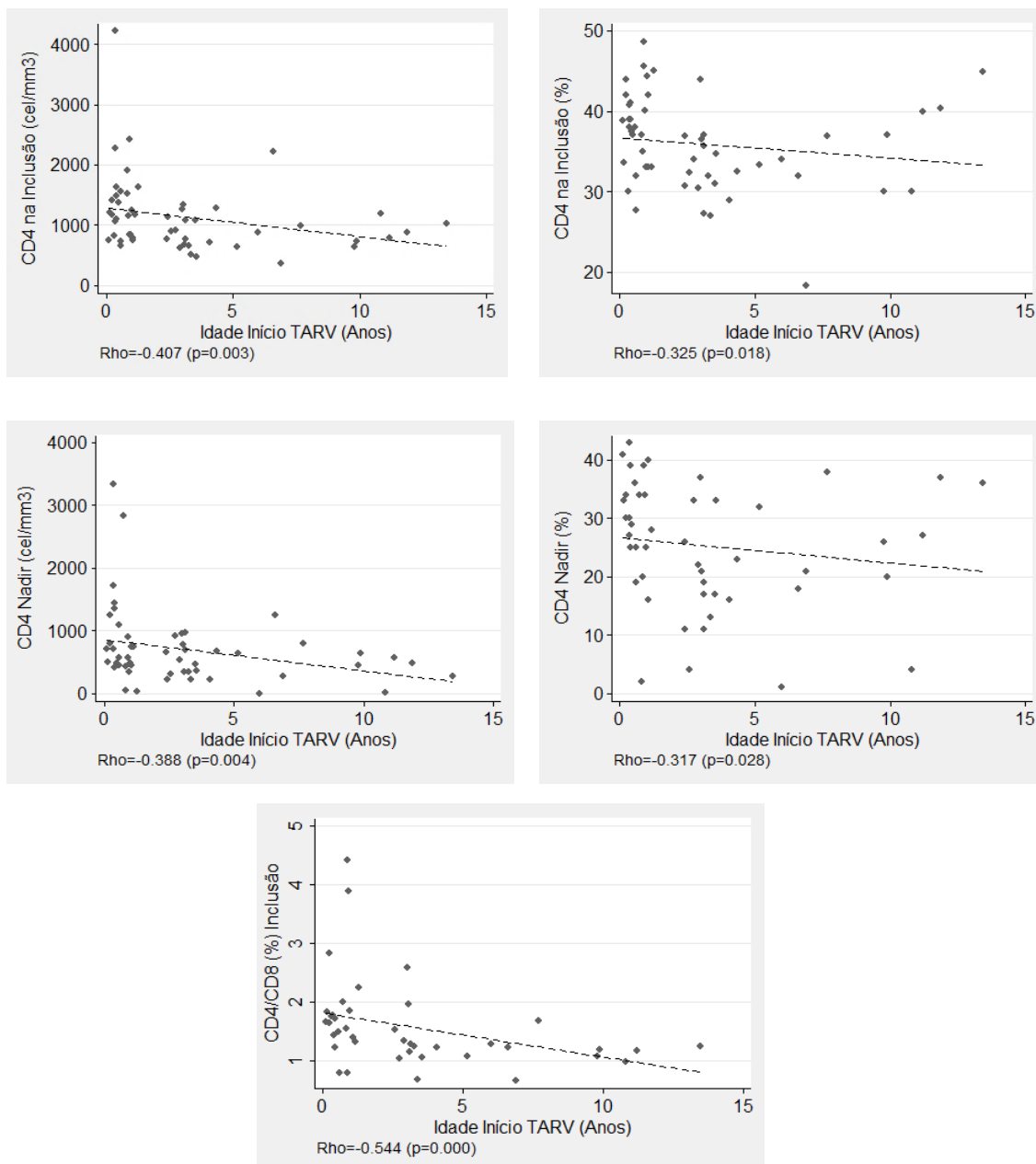


Figura 4. Correlações entre idade de início de TARV e LTCD4+ (absoluto e %) e razão LTCD4+/LTCD8+ na inclusão, e idade de início de TARV e LTCD4+ Nadir (absoluto e %).

4.4 Vacinação para Hepatite B, Hepatite A, Caxumba e Rubéola

Para o total de crianças incluídas no estudo o histórico de vacinação para Hepatite B estava disponível para 48 (87%) das crianças, enquanto que para as demais vacinas (Hepatite A e Tríplice Viral ou Tetraviral) esta informação estava

disponível para 23 (42%) crianças, porém é esperado que o histórico vacinal seja semelhante para todos os pacientes incluídos já que são acompanhados em 2 serviços de acompanhamento de infectologia pediátrica que seguem as mesmas recomendações de vacinação de crianças infectadas pelo HIV⁹⁵. No total de pacientes incluídos, as crianças apresentavam medianas de número de doses recebidas que representavam o esquema de imunização completo atualmente recomendado para cada uma das vacinas: 4 doses de vacina para a Hepatite B, 2 doses de vacina para a Hepatite A, e 2 doses de vacina Tríplice Viral (sarampo, caxumba e rubéola) ou Tetraviral (sarampo, caxumba, rubéola e varicela). A proteção verificada foi variável para cada uma das doenças entretanto: na inclusão no estudo 64% das crianças tinham anti-HBs ≥ 10 UI/L, sendo portanto imunes para Hepatite B, 80% tinham anticorpos totais contra a Hepatite A ≥ 20 UI/L, 57% tinham IgG contra a Rubéola ≥ 10 UI/ml, e somente 44% tinham IgG contra a Caxumba ≥ 11 UA/ml, sendo portanto imunes para as respectivas doenças (Figura 5).

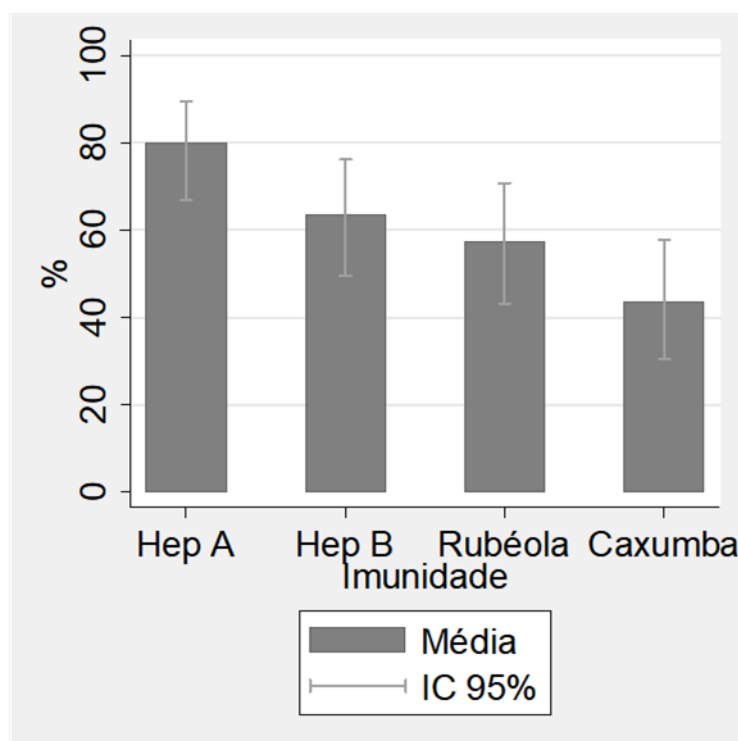


Figura 5. Proporções de imunes para a Hepatite A, Hepatite B, Rubéola e Caxumba entre as crianças incluídas no estudo.

Quando examinadas as informações de vacinação e proteção para as vacinas selecionadas nos grupos estratificados conforme a data de início de TARV, para a Hepatite B não houve diferença entre os grupos quanto ao número de doses de vacinas recebidas, porém crianças que iniciaram TARV antes dos 6 meses e entre 6 meses e 1 ano tomaram a última dose da vacina da Hepatite B em idade mais precoce que crianças que iniciaram TARV entre 1-5 anos ($p=0,025$ e $p=0,031$ respectivamente). Apesar de não estatisticamente significativa, crianças iniciando TARV antes dos 6 meses de idade e entre 6 meses e 1 ano tinham maiores títulos de anti-HBs e apresentavam maiores proporções de protegidos do que nas crianças iniciando TARV entre 1 e 5 anos e após os 5 anos. Quanto à Hepatite A não houve diferença entre os grupos quanto ao número de doses de vacinas recebidas, idade da última dose, e quanto aos títulos ou % de protegidos, porém apesar de não estatisticamente significativa o grupo de crianças iniciando TARV antes dos 6 meses apresentava maior percentual de protegidos do que os demais grupos. Para a vacina Tríplice Viral ou Tetraviral não houve diferença quanto ao número de doses de vacinas recebidas e idade da última dose entre os grupos, porém: quanto à resposta contra a Rubéola os títulos das crianças iniciando TARV antes dos 6 meses eram mais altos na inclusão no estudo do que daquelas iniciando TARV entre 1-5 anos e após os 5 anos. ($p=0,001$ e $p=0,021$ respectivamente). O percentual (%) de protegidos não foi diferente de forma estatisticamente significativa entre os grupos entretanto os grupos das crianças iniciando TARV antes dos 6 meses e entre 6 meses e 1 ano tiveram maior percentual de protegidos em relação aos dois outros grupos. Quando examinada a correlação entre idade de início de TARV e títulos para a Rubéola, crianças iniciando TARV em idades mais precoces apresentavam títulos mais altos (Correlação de Spearman, teste bicaudal; $Rho = -0,34$, $p=0,013$). Quanto à resposta contra a Caxumba, na inclusão no estudo os títulos das crianças iniciando TARV antes dos 6 meses eram mais altos do que daquelas iniciando TARV entre 1-5 anos ($p=0,006$), e o percentual (%) de protegidos para a Caxumba entre as crianças iniciando TARV antes dos 6 meses era maior do que nas crianças iniciando TARV entre 1-5 anos e após os 5 anos ($p=0,01$ e $p=0,017$ respectivamente). Além disso, de forma semelhante ao que foi observado em relação à Rubéola, crianças iniciando TARV em idades mais precoces tinham títulos mais altos para a Caxumba na inclusão no estudo (Correlação de Spearman, teste bicaudal; $Rho = -0,28$, $p=0,038$; Figura 6). A Tabela 15 detalha a informação sobre histórico vacinal e imunidade para Hepatite B e A, Rubéola e Caxumba, pesquisados neste estudo, a Tabela 16 descreve a correlação entre idade

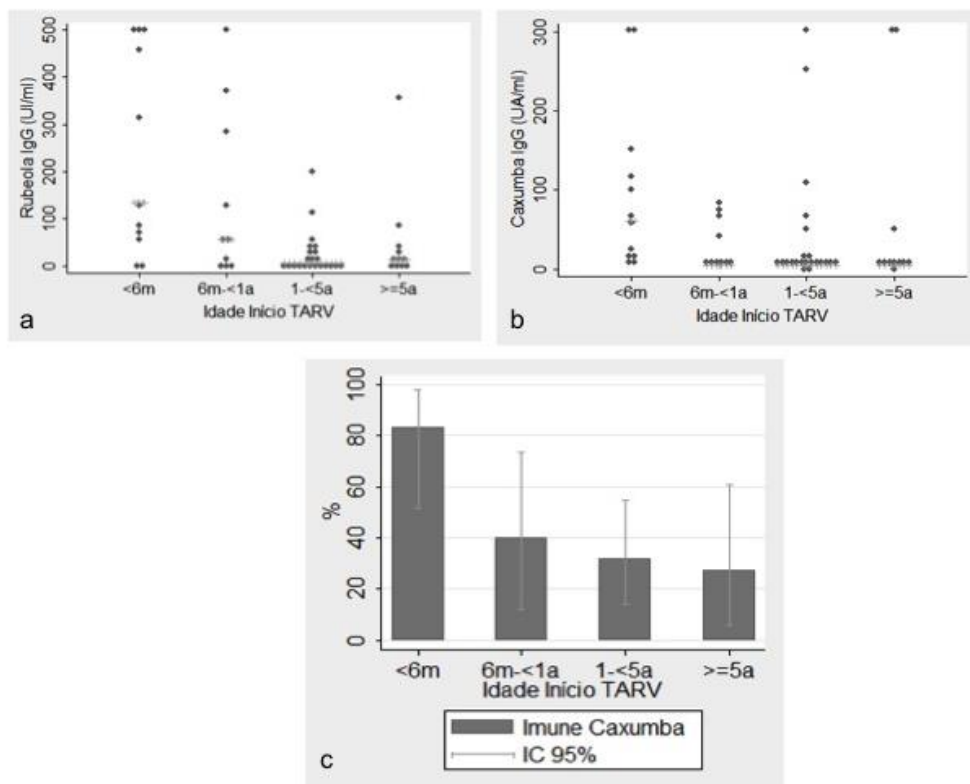
de início de TARV e títulos vacinais para os antígenos pesquisados neste estudo, enquanto que a Figura 7 ilustra a correlação entre idade de início de TARV e títulos para Rubéola e Caxumba.

Tabela 15. Vacinação e imunidade para Hepatite B, Hepatite A, Rubéola e Caxumba, no total de participantes e por grupos conforme idade de início de TARV.

	Total		<6 meses		≥6 meses e < 1 ano		≥ 1 ano e < 5 ano		≥ 5 anos		p†
	N	Total*	N	*	N	*	N	*	N	*	
Hepatite B											
Número de doses	48	4 (3,9–4,2)	9	4,0 (4,0;4,0)	10	4,0 (3,0;4,0)	19	4,0 (4,0;4,0)	10	4,0 (4,0;4,0)	0,544
Idade última dose (anos)		5,6 (4,3–6,9)		1,3 (1,3;5,3)		1,3 (1,1;6,1)		6,4 (4,2;8,4)		5,2 (2,8;9,2)	0,041^a
Tempo entre última dose e inclusão (anos)		6,6 (5,3–7,8)		5,9 (2,0;9,3)		5,0 (2,5;8,6)		8,7 (1,8;10,4)		9,2 (2,1;12,0)	0,874
Anti HBs (UI/L)	55	33,7 (2,0;281,5)	12	91,8 (14,1;396,2)	10	92,5 (2,0;342,2)	22	12,2 (2,0;129,2)	11	24,8 (2,0;200,9)	0,518
Imune (%)		63,6 (50,5–76,8)	12	75,0 (42,8–94,5)	10	70,0 (34,8–93,3)	22	54,5 (32,2–75,6)	11	63,6 (30,8–89,1)	0,684
Hepatite A											
Número de doses	23	1,9 (1,7–2,1)	6	2,0 (2,0;2,0)	8	2,0 (2,0;2,0)	6	2,0 (2,0;2,0)	3	2,0 (1,0;2,0)	0,325
Idade última dose (anos)		6,4 (4,4–8,5)		2,5 (1,5;9,4)		2,3 (1,9;6,3)		8,5 (8,0;9,6)		8,6 (6,3;13,9)	0,195
Tempo entre última dose e inclusão (anos)		4,2 (3,0–5,5)		5,8 (1,8;8,0)		5,1 (2,3;7,0)		2,6 (1,8;6,1)		1,4 (0,9;1,9)	0,207

Tabela 15. Vacinação e imunidade para Hepatite B, Hepatite A, Rubéola e Caxumba, no total de participantes e por grupos conforme idade de início de TARV (continuação).

Anticorpos Totais Hepatite A (UI/L)	55	60,0 (24,0;60,0)	12	60,0 (56,0;60,0)	10	60,0 (9,0;60,0)	22	60,0 (24,0;60,0)	11	60,0 (21,0;60,0)	0,481
Imune (%)		80,0 (69,1–90,9)	12	100,0 (73,5–100,0)	10	60,0 (26,2–87,8)	22	77,3 (54,6–92,2)	11	81,8 (48,2–97,7)	0,117
Tríplice Viral/ Tetraviral											
Número de doses	23	1,9 (1,7–2,0)	6	2,0 (2,0;2,0)	8	2,0 (2,0;2,0)	6	2,0 (2,0;2,0)	3	2,0 (2,0;2,0)	0,904
Idade última dose (anos)		4,8 (3,0–6,6)		3,1 (1,3;4,1)		3,2 (2,0;6,1)		5,5 (4,5;6,1)		7,4 (4,2;10,6)	0,465
Tempo entre última dose e inclusão (anos)		5,8 (3,6–7,9)		4,3 (3,0;6,4)		3,2 (2,5;3,6)		5,7 (2,6;12,0)		5,3 (5,2;5,3)	0,685
Rubéola IgG (UI/ml)	54	19,9 (2,2;89,8)	11	134,7 (62,3;500,0)	10	57,5 (1,9;291,3)	22	4,9 (0,9;35,1)	11	13,3 (0,4;46,4)	0,008 ^b
Rubéola Imune (%)		57,4 (43,8–71,0)	11	81,8 (48,2–97,7)	10	70,0 (34,8–93,3)	22	40,9 (20,7–63,6)	11	54,5 (23,4–83,3)	0,127
Caxumba IgG (UA/ml)	55	5,0 (5,0;66,2)	12	61,3 (17,6;138,0)	10	5,0 (5,0;65,5)	22	5,0 (5,0;15,0)	11	5,0 (5,0;54,1)	0,038 ^c
Caxumba Imune (%)		43,6 (30,1–57,2)	12	83,3 (51,6–97,9)	10	40,0 (12,2–73,8)	22	31,8 (13,9–54,9)	11	27,3 (6,0–61,0)	0,017 ^d
*Média (IC 95%) ou p50 (p25;p75). †Teste de Kruskal-Wallis ou Exato de Fisher. a <6m x 1-5a (p=0,025), 6m-1a x 1-5a (p=0,031); b <6m x 1-5a (p=0,001), <6m x ≥5a (p=0,021); c <6m x 1-5a (p=0,006); d <6m x 1-5a (p=0,01), <6m x ≥5a (p=0,017). ‡Teste de Mann-Whitney bicaudal ou exato de Fisher.											



a <6m x 1-5y: p=0,001, <6m x ≥5y: p=0,021; b <6m x 1-5a: p=0,006; c <6m x 1-5a (p=0,01), <6m x ≥5a (p=0,017). Teste de Kruskal-Wallis ou Exato de Fisher.

Figura 6. Títulos de proteção para Rubéola e Caxumba, nas crianças incluídas no estudo estratificadas por idade de início de TARV, e proporções de protegidos para a Caxumba em cada grupo.

Tabela 16. Correlação entre idade de início de TARV e títulos vacinais.

	N	rho*	p*
Anti-HBs (UI/L)"	54	-0,17	0,211
Anticorpos Totais Hep A (UI/L)	54	-0,09	0,539
Rubéola IgG (UI/ml)	53	-0,34	0,013
Caxumba IgG (UA/ml)	54	-0,28	0,038
*Correlação de Spearman, teste bicaudal			

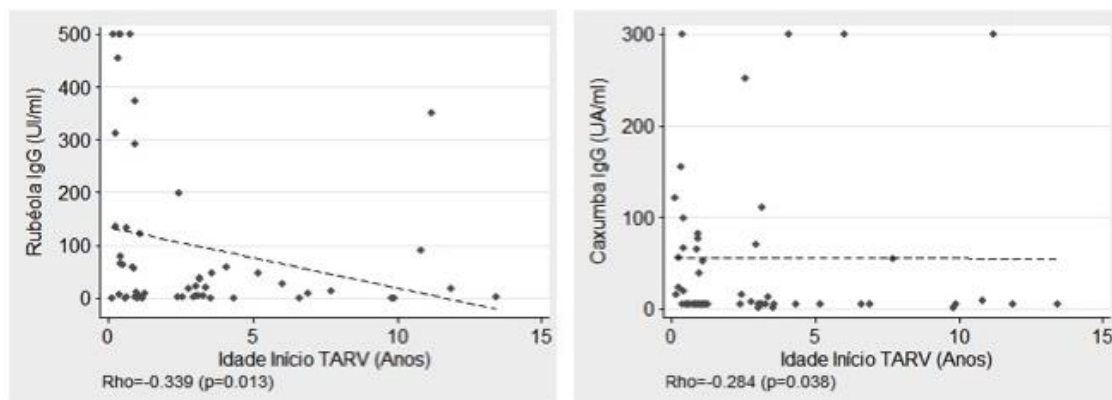


Figura 7. Correlações entre idade de início de TARV e títulos de proteção para a Rubéola e Caxumba.

4.5 Homeostase de LTCD4+ e LTCD8+

Os totais de LTCD4+ das crianças incluídas no estudo, assim como suas subpopulações, foram estudados através de técnica de citometria de fluxo descrita acima. Quando examinadas as subpopulações de LTCD4+ nas crianças estratificadas pela idade de início de TARV, viu-se que as crianças que iniciaram TARV antes dos 6 meses de idade apresentavam maior percentual de LTCD4+ total do que as crianças iniciando TARV após os 5 anos de idade ($p=0,023$), menor percentual de LTCD4+ de memória central (TCM) do que as crianças iniciando TARV após os 5 anos ($p=0,049$), e menor percentual de LTCD4+ de memória efetora (TEM) do que as crianças iniciando TARV entre 1-5 anos ($p=0,008$), e após os 5 anos ($p=0,049$). As crianças iniciando TARV entre 6 meses e 1 ano de idade por sua vez apresentavam maior percentual de LTCD4+ naïve do que crianças iniciando TARV entre 1-5 anos ($p=0,024$), e após os 5 anos ($p=0,041$), menor percentual de LTCD4+ de memória central (TCM) do que crianças iniciando TARV entre 1-5 anos ($p=0,024$), e após os 5 anos ($p=0,026$), maior percentual de LTCD4+ efetores intermediários (TINT) do que crianças iniciando TARV após os 5 anos ($p=0,033$), e menor percentual de LTCD4+ de memória efetora (TEM) do que crianças iniciando TARV entre 1-5 anos ($p=0,020$). A Tabela 17 detalha os totais de LTCD4+ e subpopulações no participantes incluídos, e estratificados quanto à idade de início de TARV.

Quando examinada a correlação entre as frequências das subpopulações de LTCD4+ e idade de início de TARV, a idade mais precoce de início de TARV estava correlacionada com maior percentual de LTCD4+ total (Correlação de Spearman, teste bicaudal; $Rho = -0,39$, $p=0,011$) e de LTCD4+ naïve (Correlação de Spearman, teste bicaudal; $Rho = -0,31$, $p=0,046$), e, de forma contrária, estava correlacionada com menores percentuais de LTCD4+ de memória central (TCM) (Correlação de Spearman, teste bicaudal; $Rho = 0,33$, $p=0,036$) e de memória efetora (TEM) (Correlação de Spearman, teste bicaudal; $Rho = 0,36$, $p=0,021$).

Tabela 17. Totais e Subpopulações de Linfócitos T CD4+, no total de participantes e nos grupos estratificados por idade de início de TARV.

	Total Participantes	<6m	6m-1a	1-5a	>5a	p§					
						<6m x 6m-1a	<6m x 1-5a	<6m x ≥5a	6m-1a x 1-5a	6m-1a x ≥5a	1-5a x ≥5a
	p50 (p25;p75)	p50 (p25;p75)	p50 (p25;p75)	p50 (p25;p75)	p50 (p25;p75)						
CD4+ (%)	47,9 (43,4;51,0)	56,1 (47,7;58,8)	55,5 (47,6;61,8)	49,4 (47,1;53,0)	47,9 (43,4;51,0)	ns	ns	0,023	ns	ns	ns
CD4+ naïve (%)	44,3 (38,6;59,4)	55,8 (51,6;70,6)	63,0 (53,3;71,2)	44,7 (35,3;51,8)	44,3 (38,6;59,4)	ns	ns	ns	0,024	0,041	ns
CD4+(TCM) (%)	28,2 (24,9;34,4)	22,5 (19,0;27,9)	20,9 (17,1;25,6)	32,4 (24,4;35,8)	28,2 (24,9;34,4)	ns	ns	0,049	0,024	0,026	ns
CD4+(TTM) (%)	9,6 (5,4;14,0)	7,7 (6,1;13,2)	7,8 (6,2;9,7)	9,0 (7,8;12,5)	9,6 (5,4;14,0)	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CD4+(TINT) (%)	1,9 (1,3;2,2)	1,8 (1,5;3,0)	2,4 (2,1;2,7)	1,9 (1,6;2,4)	1,9 (1,3;2,2)	ns	ns	ns	ns	0,033	ns
CD4+(TEM) (%)	4,6 (3,3;7,3)	3,5 (1,8;4,6)	3,3 (1,9;4,3)	5,3 (4,1;7,9)	4,6 (3,3;7,3)	ns	0,008	0,049	0,02	ns	ns
CD4+(TTE) (%)	2,7 (2,3;5,1)	1,4 (1,0;3,2)	1,5 (0,8;2,8)	2,1 (1,0;3,1)	2,7 (2,3;5,1)	ns	ns	ns	ns	ns	ns
p§ Teste de Mann Whitney, bicaudal											

De forma análoga, os totais de LTCD8+ das crianças incluídas no estudo, assim como suas subpopulações, foram estudados através de citometria de fluxo. Quando examinadas as subpopulações de LTCD8+ nas crianças estratificadas pela idade de início de TARV, viu-se que as crianças que iniciaram TARV antes dos 6 meses de idade apresentavam menor percentual de LTCD8+ total do que as crianças iniciando TARV entre 1-5 anos ($p=0,013$) e após os 5 anos de idade ($p=0,001$), e menor percentual de LTCD8+ de memória efetora terminal (TTE) do que as crianças iniciando TARV após os 5 anos ($p=0,028$). As crianças iniciando TARV entre 6 meses e 1 ano de idade por sua vez apresentavam menor percentual de LTCD8+ de memória central (TCM) do que crianças iniciando TARV entre 1-5 anos ($p=0,028$). A Tabela 18 detalha os totais de LTCD8+ e subpopulações no participantes incluídos, e estratificados quanto à idade de início de TARV.

Quando examinada a correlação entre as frequências das subpopulações de LTCD8+ e idade de início de TARV, a idade mais precoce de início de TARV estava correlacionada com menor percentual de LTCD8+ total (Correlação de Spearman, teste bicaudal; $Rho = 0,56$, $p=0,000$), de LTCD8+ de memória efetora –TEM (Correlação de Spearman, teste bicaudal; $Rho = 0,31$, $p=0,046$) e efetora terminal – TTE (Correlação de Spearman, teste bicaudal; $Rho = 0,38$, $p=0,013$).

Tabela 18. Totais e Subpopulações de Linfócitos T CD8+, no total de participantes e nos grupos estratificados por idade de início de TARV.

	Total Participantes	<6m	6m-1a	1-5a	>5a	p§					
						<6m x 6m-1a	<6m x 1-5a	<6m x ≥5a	6m-1a x 1-5a	6m-1a x ≥5a	1-5a x ≥5a
CD8+ (%)	38,5 (31,6;42,1)	32,5 (31,0;33,5)	32,6 (22,9;41,1)	39,8 (34,1;42,2)	41,3 (39,9;42,8)	ns	0,013	0,001	ns	ns	ns
CD8+ naïve (%)	40,0 (32,4;49,5)	47,6 (32,5;66,9)	40,4 (38,5;45,1)	39,5 (30,7;46,1)	32,5 (22,3;47,5)	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CD8+(TCM) (%)	5,4 (3,5;7,6)	4,6 (3,4;10,3)	3,5 (2,1;6,4)	6,7 (5,8;8,4)	5,3 (4,0;5,4)	ns	ns	ns	0,028	ns	ns
CD8+(TTM) (%)	19,5 (14,1;26,9)	15,3 (11,8;27,9)	18,9 (12,9;28,3)	18,6 (14,8;30,5)	22,4 (17,5;24,8)	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CD8+(TINT) (%)	10,7 (6,7;12,7)	9,0 (6,7;11,2)	11,6 (8,7;14,7)	10,4 (6,1;11,5)	10,4 (6,7;12,9)	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CD8+(TEM) (%)	8,0 (3,1;11,7)	5,7 (1,3;9,0)	6,5 (3,6;10,5)	7,1 (3,1;11,7)	11,4 (7,4;12,9)	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CD8+(TTE) (%)	10,9 (7,0;17,2)	7,4 (3,2;11,8)	8,3 (2,7;23,7)	12,5 (7,8;15,9)	14,6 (9,3;19,3)	ns	ns	0,028	ns	ns	ns

§ Teste de Mann-Whitney bicaudal

4.6 Marcadores de senescência, apoptose, exaustão, energia e ativação em LTCD4+

A Figura 8 mapeia as correlações entre idade de início de TARV e as frequências de marcadores de ativação (CD38+, HLA-DR+, CCR5+), apoptose (CD95+), senescência (CD57+), exaustão (PD-1+) e energia (CD28-), em diferentes combinações, nas várias subpopulações de LTCD4+. As correlações positivas estão representadas nos tons de vermelho, enquanto que as correlações negativas estão representadas pelos tons de azul. Correlações mais fortes (isto é, com Rho mais distante do 0) estão representadas por coloração de maior intensidade. Níveis de significância das correlações estão marcados com um (*) quando $p < 0,05$, dois (**) quando $p < 0,01$ e três (***) quando $p < 0,001$. A leitura do heat map nos indica que foram significantes as seguintes correlações com idade de início de TARV:

- Positiva, marcadores de ativação (CD38+CCR5+; CD38+HLADR+) em LTCD4+ naïve;
- Positiva, marcador de apoptose (CD95+) em LTCD4+ total, naïve e de memória central (TCM);
- Positiva, marcador de apoptose (CD95+) em LTCD4+ total, naïve e de memória central (TCM), inclusive em LTCD4+ total e naïve recém egressos do timo (CD31+);
- Positiva, marcador de senescência (CD57+), também associado a marcadores de exaustão (PD1+) e apoptose (CD95+), em células de memória transitória (TTM) recém egressas do timo (CD31+CD57+);
- Positiva, marcadores de anergia (CD28-) e exaustão (PD1+) em LTCD4+ naïve;
- Positiva, totais de LTCD4+ de memória central (TCM) e de memória efetora (TEM);
- Negativa, marcadores de anergia (CD28-), exaustão (PD1+) e senescência (CD57+) em LTCD4+ de memória transitória (TTM);
- Negativa, total de LTCD4+ e LTCD4+ naïve.

Marcadores em LTCD4+	Naïve	TCM	TTM	TINT	TEM	TTE	TOTAL
CD38+CCR5+	*						
CD38+HLA-DR+	*						
HLA- DR+ CCR5+							
CD38+HLA-DR+CCR5+							
CD31+							
CD57+							
CD95+	*	*					*
PD1+							
CD31+ CD57+			*				
CD31+ CD95+	**						*
CD31+ PD-1+							
CD31+ PD-1+ CD57+ CD95+ (%)			*				
CD57+ CD95+				*			
PD1+CD57+							
PD-1+ CD57+ CD95+ (%)							
PD1+CD95+							
CD28- CD57+ (%)							
CD28- CD95+ (%)							
CD28- PD-1+ (%)	**						
CD28- PD-1+ CD57+ (%)			*				
TOTAL	*	*			*		*
Correlação negativa							
Correlação positiva							

Figura 8. Heat map de marcadores de senescência, apoptose, exaustão, anergia e ativação nas subpopulações de LTCD4+. Correlação de Spearman, teste bicaudal. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

A Figura 9 (abaixo) ilustra algumas subpopulações de LTCD4+ com marcadores de apoptose (CD95+), senescência (CD57+) e exaustão (PD-1+) com correlação positiva com idade de início de TARV.

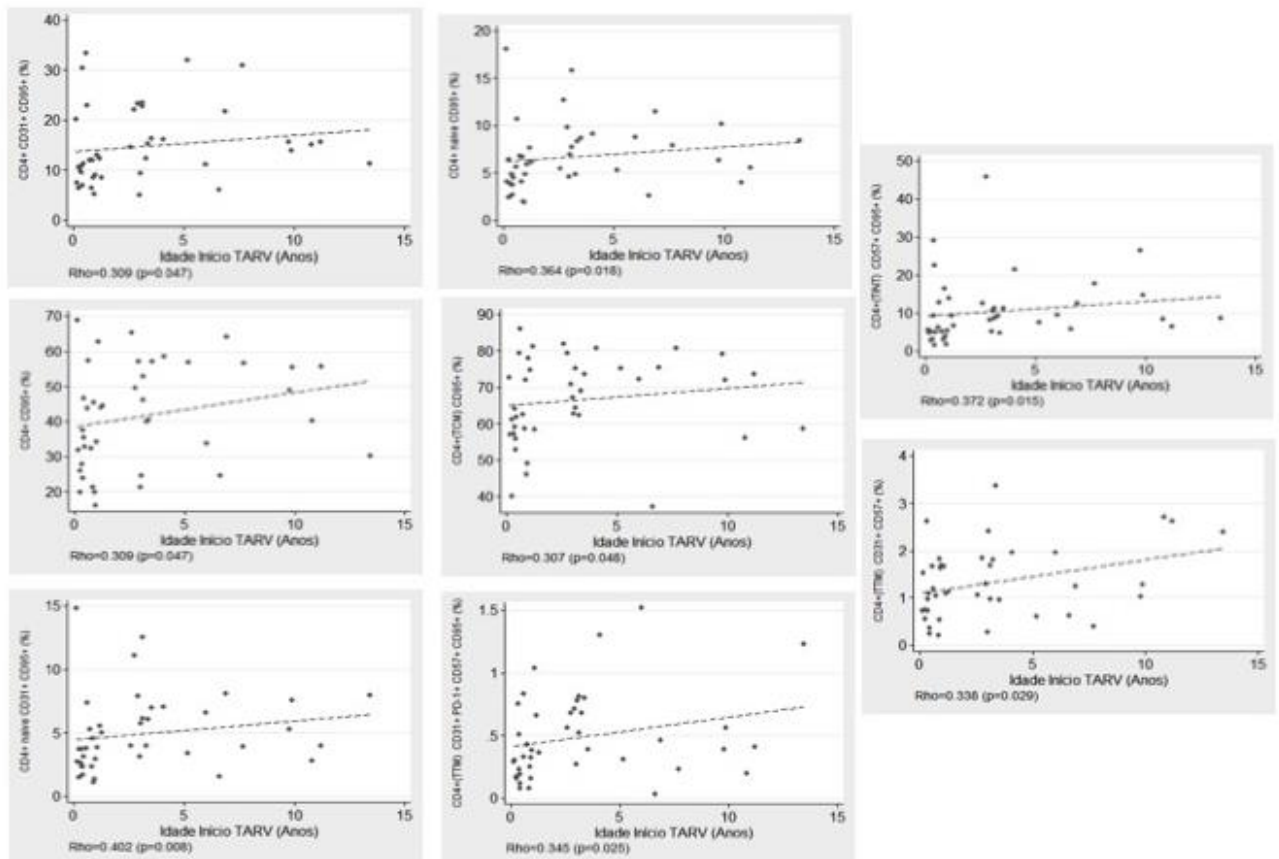


Figura 9. Subpopulações de LTCD4+ com marcadores de apoptose (CD95+), senescência (CD57+) e exaustão (PD-1+) em LTCD4+ com correlação positiva com idade de início de TARV.

Examinaram-se então as frequências dos marcadores nos grupos estratificados por idade de início de TARV, para explorar se as crianças iniciando TARV em idades mais precoces apresentavam melhores desfechos imunes, incluindo padrões mais favoráveis em relação ao status de maturação do sistema imune celular. Os achados serão aqui descritos segundo as subpopulações de LTCD4+.

Viu-se que crianças iniciando TARV antes dos 6 meses de idade apresentavam menores frequências, em **LTCD4+ total** :

- de marcador de diferenciação celular (CD45RA-) do que crianças iniciando TARV entre 1 e 5 anos ($p=0,035$);
- de marcadores de ativação: CD38+ do que crianças iniciando TARV entre 6 meses e 1 ano ($p=0,037$) , de duplo marcador de ativação (CD38+ HLA- DR+) do que crianças iniciando TARV entre 6 meses e 1 ano ($p=0,014$), 1 e 5 anos ($p=0,018$), e após os 5 anos ($p=0,037$), e de triplo marcador de ativação (CD38+ HLA- DR+ CCR5+) do que crianças iniciando TARV entre 1 e 5 anos ($p=0,034$).
- de marcadores de apoptose (CD95+), de exaustão (PD1+) e de senescência (CD57+) do que crianças iniciando TARV entre 1 e 5 anos, nas seguintes combinações:
 - » CD4+CD95+ ($p=0,027$)
 - » CD4+PD1+ ($p=0,014$)
 - » CD4+PD1+CD57+ ($p=0,049$)
 - » CD4+PD-1+ CD57+ CD95+ ($p=0,030$)
 - » CD4+PD-1+ CD95+ ($p=0,026$)
 - » CD4+CD31+ PD-1+ CD57+ CD95+ ($p=0,030$)

Crianças iniciando TARV antes dos 6 meses de idade apresentavam menores frequências, em **LTCD4+ naïve** :

- de marcadores de ativação do que crianças iniciando TARV entre 6 meses e 1 ano: CD4+ naïve CD38+, $p=0,033$; CD4+ naïve CCR5+, $p=0,023$
- de marcadores de ativação em LTCD4+ naïve do que crianças iniciando TARV entre 6 meses e 1 ano, 1 e 5 anos , e após os 5 anos: CD4+ naïve CD38+ CCR5+ ($p=0,018$; $p=0,030$; $p=0,002$); CD4+ naïve CD38+ HLA- DR+ ($p=0,020$; $p=0,025$; $p=0,004$)
- de marcadores de apoptose (CD95+) e senescência (CD57+) – inclusive em células recém egressas do timo (CD31+) – em LTCD4+ naïve do que crianças iniciando TARV entre 1 e 5 anos:
 - » CD4+ naïve CD95+ ($p=0,003$)
 - » CD4+ naïve CD31+ CD95+ ($p=0,002$). Também Vs. crianças iniciando TARV após os 5 anos ($p=0,041$)

- » CD4+ naíve CD31+ CD57+ (p=0,028)
- » CD4+ naíve CD57+ CD95+ (p=0,017)
- de marcador de exaustão (PD1+) em LTCD4+ naíve do que crianças iniciando TARV após os 5 anos: CD4+ naíve CD28- PD-1+ (p=0,023)

Crianças iniciando TARV antes dos 6 meses de idade tinham menores frequências, em **LTCD4+ de memória central (TCM)** :

- de marcador de apoptose (CD95+) em LTCD4+ (TCM) que crianças iniciando TARV entre 1 e 5 anos e após os 5 anos de idade: CD4(TCM) CD95+ (p=0,001; p=0,049);
- de marcadores de senescência (CD57+), apoptose (CD95+) e exaustão (PD-1+) – inclusive em células recém egressas do timo (CD31+) - em LTCD4+ (TCM) que crianças iniciando TARV entre 1 e 5 anos, nas seguintes combinações:
 - » CD4+(TCM) CD57+ (p=0,043)
 - » CD4+(TCM) CD28+ CD57+ (p=0,043)
 - » CD4+(TCM) CD28+ CD95+ (p=0,001)
 - » CD4+(TCM) CD31+ CD57+ (p=0,040)
 - » CD4+(TCM) CD31+ CD95+ (p=0,040)
 - » CD4+(TCM) CD31+ PD-1+ CD57+ CD95+ (p=0,026)
 - » CD4+(TCM) CD57+ CD95+ (p=0,043)
 - » CD4+(TCM) PD-1+ CD57+ (p=0,028)
 - » CD4+(TCM) PD-1+ CD57+ CD95+ (p=0,023)
- de marcador de ativação (CCR5+) em LTCD4+ (TCM) que crianças iniciando TARV entre 1 e 5 anos: CD4+(TCM) CCR5+ (p=0,031).

Crianças iniciando TARV antes dos 6 meses de idade tinham menores frequências, em **LTCD4+ de memória transitória (TTM)** :

- de marcadores de ativação (HLA-DR+) e exaustão (PD1+), em relação a crianças iniciando TARV entre 6 meses e 1 anos: CD4+(TTM) HLA- DR+ (p=0,041); CD4+(TTM) CD31+ PD-1+ (p=0,033);
- de marcadores de exaustão (PD1+), senescência (CD57+) e apoptose (CD95+), em relação a crianças iniciando TARV entre 1 e 5 anos:
 - » CD4+(TTM) CD31+ PD-1+ CD57+ CD95+ (p=0,002)

- » CD4+(TTM) PD-1+ CD57+ CD95+ ($p=0,009$)
- » CD4+(TTM) CD28+ CD95+ ($p=0,011$)
- » CD4+(TTM) CD28- CD57+ ($p= 0,037$)
- » CD4+(TTM) CD31+ CD57+ ($p=0,043$)
- » CD4+(TTM) CD31+ CD95+ ($p=0,018$)
- » CD4+(TTM) CD31+ PD-1+ ($p=0,014$) ; também quando comparado às crianças iniciando TARV entre 6 meses e 1 ano ($p=0,033$).
- » CD4+(TTM) PD-1+ CD95+ ($p=0,018$)

Crianças iniciando TARV antes dos 6 meses de idade tinham menores frequências, em **LTCD4+ de memória intermediária (TINT)** :

- de marcador de apoptose (CD95+), em relação a crianças iniciando TARV entre 1 e 5 anos: CD4+(TINT) CD95+ ($p=0,046$) ; CD4+(TINT) CD31+ CD95+ ($p=0,04$)
- de dupla marcação de apoptose (CD95+) e senescência (CD57+), em relação a crianças iniciando TARV após os 5 anos: CD4+(TINT) CD57+ CD95+ ($p=0,049$)

Crianças iniciando TARV antes dos 6 meses de idade tinham menores frequências, em **LTCD4+ de memória efetora (TEM)**, de marcadores de apoptose (CD95+), ativação, exaustão, senescência em relação a crianças iniciando TARV entre 1 e 5 anos:

- » CD4+(TEM) ($p=0,008$) ; também vs. crianças iniciando TARV após os 5 anos ($p=0,049$)
- » CD4+(TEM) CD95+ ($p=0,040$)
- » CD4+(TEM) CD38+ HLA- DR+ ($p=0,032$)
- » CD4+(TEM) CD38+ HLA- DR+ CCR5+ ($p=0,036$)
- » CD4+(TEM) PD-1+ CD57+ ($p=0,040$)
- » CD4+(TEM) PD-1+ CD57+ CD95+ ($p=0,030$)

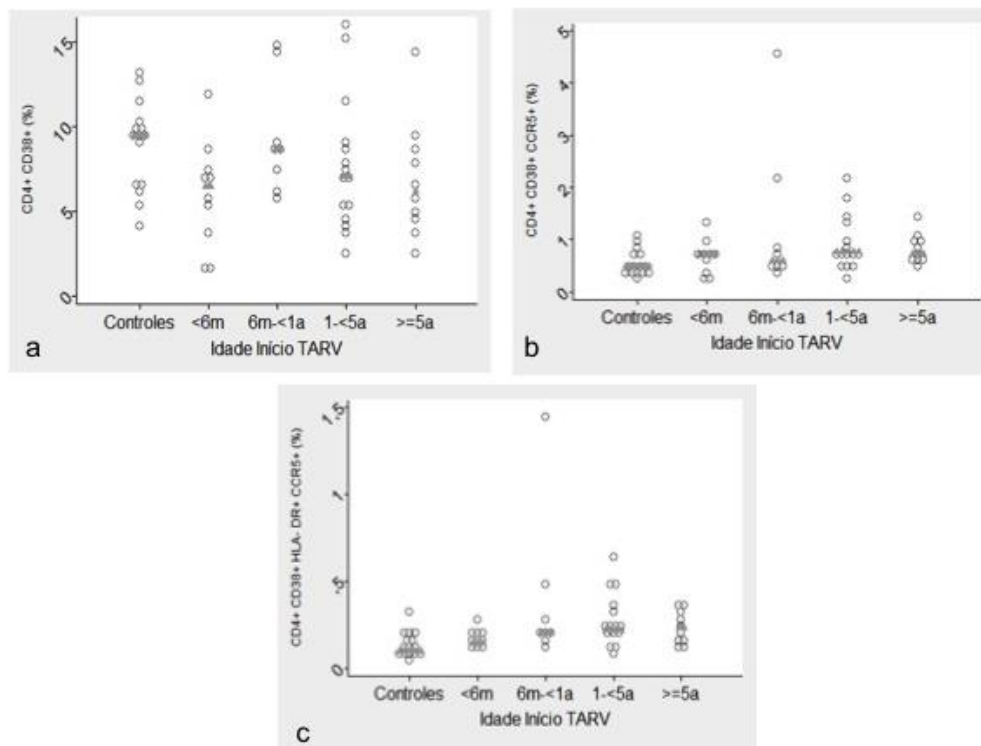
Crianças iniciando TARV antes dos 6 meses de idade tinham menores frequências, em **LTCD4+ de memória efetora terminal (TTE)** , de marcador de ativação (CCR5+, CD38+ HLA- DR+) em relação a crianças iniciando TARV entre 1 e 5 anos: CD4+(TTE) CCR5+ ($p=0,009$); CD4+(TTE) CD38+ HLA- DR+ CCR5+

($p=0,038$) – este último também vs. crianças iniciando TARV após os 5 anos ($p=0,040$).

Corroborando com os dados clínicos descritos anteriormente, também no painel de citometria de fluxo as crianças iniciando TARV antes dos 6 meses de idade tinham maiores frequências de LTCD4+(%) total em relação a crianças iniciando TARV após os 5 anos de idade ($p=0,023$). Crianças iniciando TARV antes dos 6 meses de idade apresentaram também maiores frequências:

- de LTCD4+ naïve em relação a crianças iniciando TARV entre 1 e 5 anos e após os 5 anos de idade ($p=0,024$; $p=0,041$);
- de LTCD4+ de memória transitória (TTM) e efetora (TEM) com marcador de ativação (CCR5+) em relação a crianças iniciando TARV após os 5 anos de idade: CD4+(TTM) CCR5+ ($p=0,013$); CD4+(TEM) CCR5+ ($p=0,010$);
- de LTCD4+ de memória efetora terminal (TTE) com marcador de exaustão (PD1+) e anergia (CD28-) em relação a crianças iniciando TARV após os 5 anos de idade: CD4+(TTE) CD28- PD-1+ ($p=0,026$); CD4+(TTE) PD-1+ ($p=0,026$).

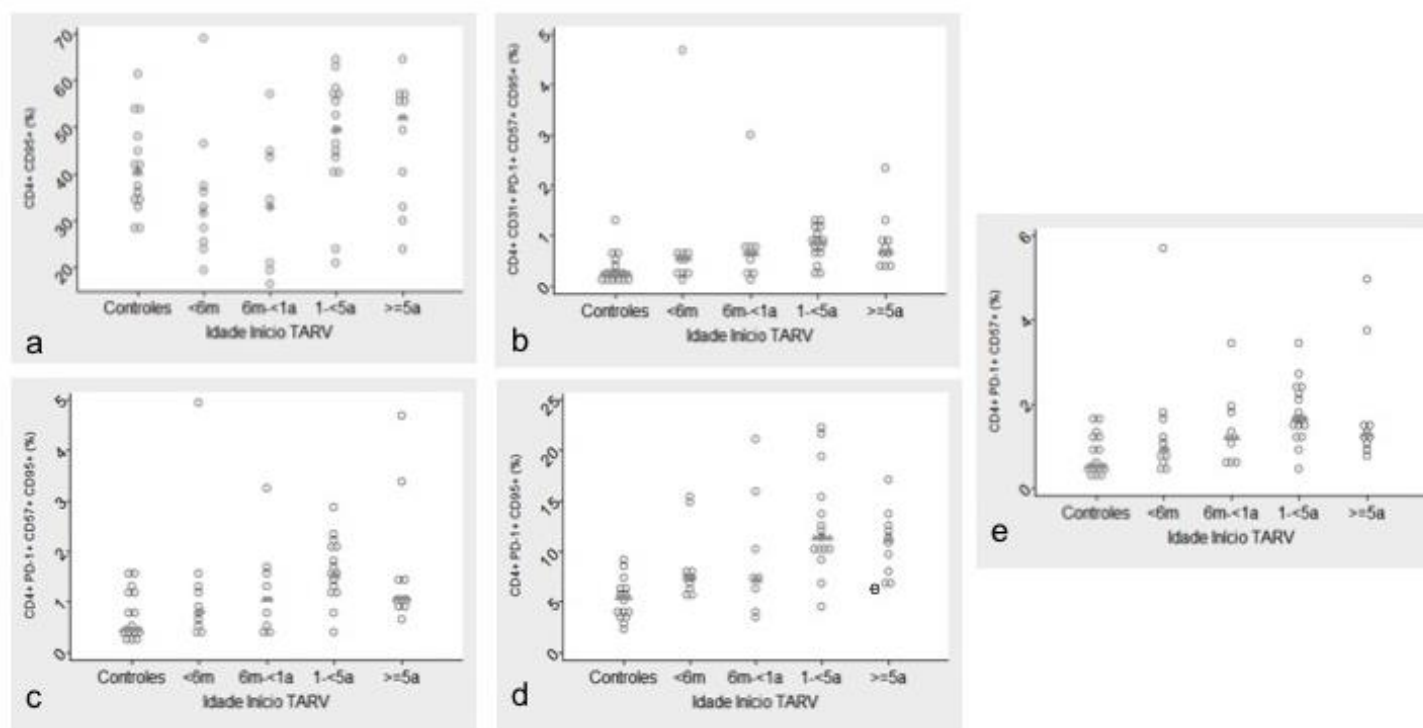
A Figura 10 ilustra subpopulações de LTCD4+ total com marcadores de ativação (CD38+, HLA-DR+, CCR5+): crianças iniciando TARV antes dos 6 meses apresentam menores frequências destas subpopulações marcadas.



a 6m vs. 6m-1a (p=0,037); b 6m vs. 1 e 5a (p=0,034); c 6m vs. 6m-1 a (p=0,014), 1 e 5 a (p=0,018), e ≥5 a (p=0,037)

Figura 10. Marcadores de ativação celular em LTCD4+ das crianças incluídas, estratificadas pela idade de início de TARV.

De forma semelhante, a Figura 11 ilustra como crianças iniciando TARV antes dos 6 meses de idade apresentavam menores frequências de marcadores de apoptose (CD95+), de exaustão (PD1+) e de senescência (57+) em LTCD4+ do que crianças iniciando TARV entre 1 e 5 anos.



a $p=0,027$; b $p=0,030$; c $p=0,049$; d $p=0,030$; e $p=0,026$.

Figura 11. LTCD4+ com marcadores de apoptose (CD95+), de exaustão (PD-1+) e de senescência (CD57+) nas crianças incluídas no estudo: crianças iniciando TARV <6m tem menores frequências destes marcadores do que crianças iniciando TARV entre 1 e 5 a.

Também de interesse do estudo foi examinar possíveis benefícios observados no grupo de crianças iniciando TARV entre 6 meses e 1 ano de idade. No momento de inclusão no estudo este grupo apresentou menores frequências :

- de marcador de diferenciação (CD45RA-) em LTCD4+ total do que crianças iniciando TARV entre 1 e 5 anos ($p=0,045$) e após os 5 anos ($p=0,041$);
- de marcador de apoptose (CD95+) em LTCD4+ total do que crianças iniciando TARV entre 1 e 5 anos ($p=0,031$);
- de marcadores de apoptose (CD95+) – inclusive em células recém egressas do timo (CD31+) – e senescência (CD57+) em LTCD4+ naïve do que crianças iniciando TARV entre 1 e 5 anos:
 - » CD4+ naïve CD95+ ($p=0,039$)
 - » CD4+ naïve CD31+ CD95+ ($p=0,014$)
 - » CD4+ naïve CD57+ CD95+ ($p=0,045$)
- de LTCD4+ de memória transitória (TTM) com marcadores de exaustão (PD1+), senescência (CD57+) e apoptose (CD95+), em relação a crianças iniciando TARV entre 1 e 5 anos: CD4+(TTM) CD31+ PD-1+ CD57+ CD95+ ($p=0,002$); CD4+(TTM) PD-1+ CD57+ CD95+ ($p=0,045$);
- de LTCD4+ de memória intermediária (TINT) com dupla marcação de apoptose (CD95+) e senescência (CD57+), em relação a crianças iniciando TARV após os 5 anos: CD4+(TINT) CD57+ CD95+ ($p=0,033$);
- de LTCD4+ de memória efetora (TEM) total e com marcador de apoptose (CD95+) em relação a crianças iniciando TARV entre 1 e 5 anos: CD4+(TEM) ($p=0,020$); CD4+(TEM) CD95+ ($p=0,030$).

O mesmo grupo, de crianças iniciando TARV entre 6 meses e 1 ano apresentou maiores frequências de LTCD4+ naïve em relação a crianças iniciando TARV entre 1 e 5 anos e após os 5 anos de idade ($p=0,024$; $p=0,041$). Surpreendentemente, o grupo de crianças iniciando TARV entre 6 meses e 1 ano apresentou também maiores frequências:

- de LTCD4+ de memória transitória (TTM) e efetora (TEM) com marcador de ativação (CCR5+) em relação a crianças iniciando TARV após os 5 anos de idade: CD4+(TTM) CCR5+ ($p=0,013$); CD4+(TEM) CCR5+ ($p=0,010$);

- de LTCD4+ de memória efetora terminal (TTE) com marcador exaustão (PD1+) e anergia (CD28-) em relação a crianças iniciando TARV após os 5 anos de idade: CD4+(TTE) CD28- PD-1+ ($p=0,026$); CD4+(TTE) PD-1+ ($p=0,026$).

Crianças iniciando TARV entre 1 e 5 anos de idade tiveram maiores frequências de LTCD4+ de memória efetora (TEM) em relação a crianças iniciando TARV antes dos 6 meses de idade: CD4+(TEM), $p=0,008$. Este mesmo grupo surpreendentemente teve maiores frequências de LTCD4+ de memória transitória (TTM), efetora (TEM) e intermediária (TINT) com marcador de ativação (CCR5+) em relação a crianças iniciando TARV após os 5 anos:

- » CD4+(TTM) CCR5+ ($p=0,040$)
- » CD4+(TEM) CCR5+ ($p=0,009$)
- » CD4+(TINT) CCR5+ ($p=0,030$)

Em resumo, quando examinadas as frequências dos marcadores nos grupos estratificados por idade de início de TARV, viu-se que crianças iniciando TARV antes dos 6 meses de idade apresentavam menores frequências de marcadores de ativação (CD38+, HLA-DR+, CCR5+) em LTCD4+ totais, de memória central (TCM) e efetora (TTM, TEM, TTE); e menores frequências de marcadores de apoptose (CD95+), de exaustão (PD-1+), de anergia (CD28-) e de senescência (CD57+), inclusive em células recém egressas do timo (CD31+), em LTCD4+ totais, naíve, de memória central (TCM) e efetora (TTM, TINT, TEM). Por sua vez, crianças iniciando TARV entre 6 meses e 1 ano de idade apresentavam menores frequências de marcador de apoptose (CD95+) e senescência (CD57+) em LTCD4+ total, naíve, e de memória efetora (TTM, TINT e TEM)– inclusive em células recém egressas do timo (CD31+).

4.7 Marcadores de senescência, apoptose, exaustão e ativação em LTCD8+

A Figura 12 mapeia as correlações entre idade de início de TARV e as frequências de marcadores de ativação (CD38+, HLA-DR+, CCR5+), apoptose (CD95+), senescência (CD57+), exaustão (PD-1+) e anergia (CD28-), em diferentes

combinações, como descrito acima, nas várias subpopulações de LTCD8+. A leitura do heat map nos indica que foram significantes as seguintes correlações com idade de início de TARV:

- Positiva, marcadores de ativação (HLA-DR+CCR5+) em LTCD8+ de memória intermediária (TINT);
- Positiva, de células de memória transitória (TTM) recém egressas do timo (CD31+);
- Positiva, de marcador de senescência (CD57+) em LTCD8+ total e de memória central (TCM), inclusive em LTCD8+ de memória central (TCM), de memória transitória (TTM), de memória efetora (TEM) e totais recém egressos do timo (CD31+);
- Positiva, marcador de apoptose (CD95+) em LTCD8+ total, naïve, de memória central (TCM), de memória transitória (TTM), intermediária (TINT), e de memória efetora terminal (TTE), inclusive em LTCD8+ naïve, de memória transitória (TTM), intermediária (TINT) e totais recém egressos do timo (CD31+);
- Positiva, marcador de exaustão (PD-1+) em LTCD8+ total e de memória transitória (TTM) recém egressos do timo (CD31+);
- Positiva, de marcadores de exaustão (PD-1+), senescência (CD57+) e apoptose (CD95+) em LTCD8+ de memória central (TCM), de memória transitória (TTM), intermediária (TINT) e totais recém egressos do timo (CD31+);
- Positiva, de marcadores de senescência (CD57+) e apoptose (CD95+) em LTCD8+ de memória central (TCM), de memória transitória (TTM), intermediária (TINT) e efetora terminal (TTE) e total;
- Positiva, de marcadores de exaustão (PD-1+), senescência (CD57+) e apoptose (CD95+) em LTCD8+ de memória central (TCM) e de memória transitória (TTM);
- Positiva, de marcadores de anergia (CD28-) e senescência (CD57+) em LTCD8+ total;
- Positiva, de marcadores de anergia (CD28-) e apoptose (CD95+) em LTCD8+ de memória intermediária (TINT), efetora terminal (TTE) e total;
- Positiva, total de LTCD8+ e LTCD8+ de memória efetora (TEM) e efetora terminal (TTE).

A Figura 13 ilustra exemplos de correlações positivas entre idade de início de TARV e marcadores de apoptose (CD95+), senescência (CD57+) e exaustão (PD-1+) em LTCD8+ total.

CD8	Naive	TCM	TTM	TINT	TEM	TTE	TOTAL
CD38+CCR5+							
CD38+HLA-DR+							
HLA- DR+ CCR5+				*			
CD38+HLA-DR+CCR5+							
CD31+			*				
CD57+		*					*
CD95+	*	*	**	*		**	*
PD1+							
CD31+ CD57+		*	*		*		**
CD31+ CD95+	*		**	**			**
CD31+ PD-1+			**				*
CD31+ PD-1+ CD57+ CD95+ (%)		*	**	*			*
CD57+ CD95+		*	*	*		*	*
PD1+CD57+							
PD-1+ CD57+ CD95+ (%)		*	*				
PD1+CD95+			*				
CD28- CD57+ (%)							*
CD28- CD95+ (%)				*		**	*
CD28- PD-1+ (%)							
CD28- PD-1+ CD57+ (%)							
TOTAL					*	*	***
Correlação negativa							
Correlação positiva							

Figura 12. Heat map de marcadores de senescência, apoptose, exaustão, anergia e ativação nas subpopulações de LTCD8+. Correlação de Spearman, teste bicaudal. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

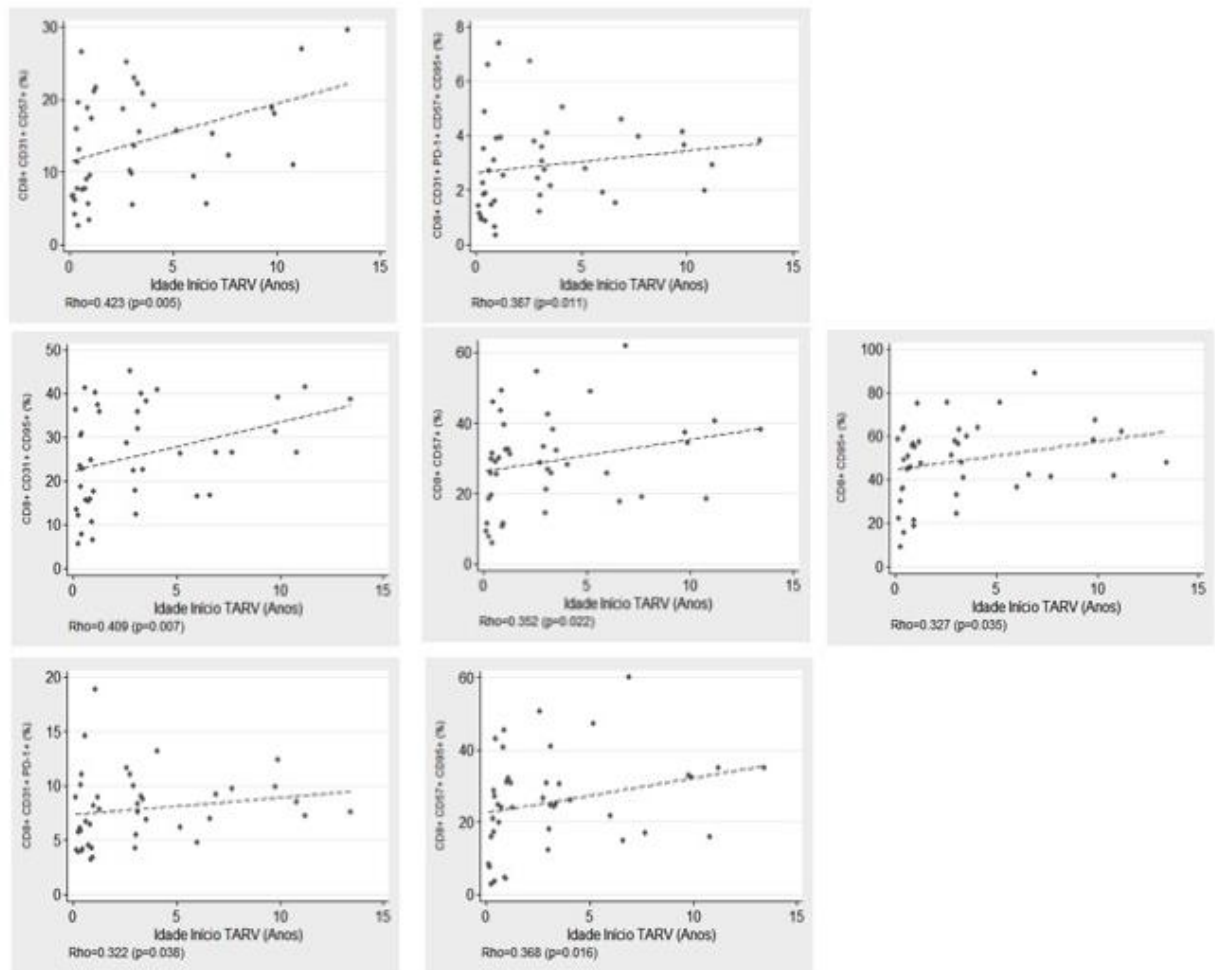


Figura 13. Exemplos de correlações positivas entre idade de início de TARV e marcadores de apoptose (CD95+), senescência (CD57+) e exaustão (PD-1+) em LTCD8+ total.

De forma análoga ao que foi feito na subpopulação de LTCD4+, examinaram-se então as frequências dos marcadores nos grupos estratificados por idade de início de TARV, na subpopulação de LTCD8+, para explorar o estado de inflamação e maturação celular desta subpopulação de células T das crianças incluídas. Os achados serão aqui descritos segundo as subpopulações linfocitárias de LTCD8+ e estão demonstrados na Figura 14.

Crianças iniciando TARV antes dos 6 meses de idade tinham menores frequências de LTCD8+ total do que crianças iniciando TARV entre 1 e 5 anos

($p=0,013$) e após os 5 anos de idade ($p=0,001$). Além disso, este grupo apresentava menores frequências:

- Em **LTCD8+ total**:
- de marcadores de senescência (CD57+), exaustão (PD1+), anergia (CD28-) e apoptose (CD95+):
 - » CD8+ CD57+ do que crianças iniciando TARV entre 1 e 5 anos ($p=0,035$) e após os 5 anos ($p=0,049$);
 - » CD8+ CD28+ CD57+ do que crianças iniciando TARV entre 1 e 5 anos ($p=0,011$);
 - » CD8+ PD1+ do que crianças iniciando TARV entre 1 e 5 anos ($p=0,049$);
 - » CD8+ CD28+ PD-1+ do que crianças iniciando TARV entre 1 e 5 anos ($p=0,015$);
 - » CD8+ CD57+ CD95+ do que crianças iniciando TARV entre 1 e 5 anos ($p=0,046$) e após os 5 anos ($p=0,045$);
 - » CD8+ PD-1+ CD95+ do que crianças iniciando TARV entre 1 e 5 anos ($p=0,049$);
 - » CD8+ CD28- CD57+ do que crianças iniciando TARV após os 5 anos ($p=0,049$);
 - » CD8+ CD28- CD95+ do que crianças iniciando TARV após os 5 anos ($p=0,038$);
 - » CD8+ CD31+ PD-1+ CD57+ CD95+ do que crianças iniciando TARV entre 1 e 5 anos ($p=0,009$) e após os 5 anos ($p=0,023$).
- de marcador de ativação (HLA-DR+) do que crianças iniciando TARV após os 5 anos ($p=0,049$).

- Em **LTCD8+ naïve** :
- de marcadores de ativação:

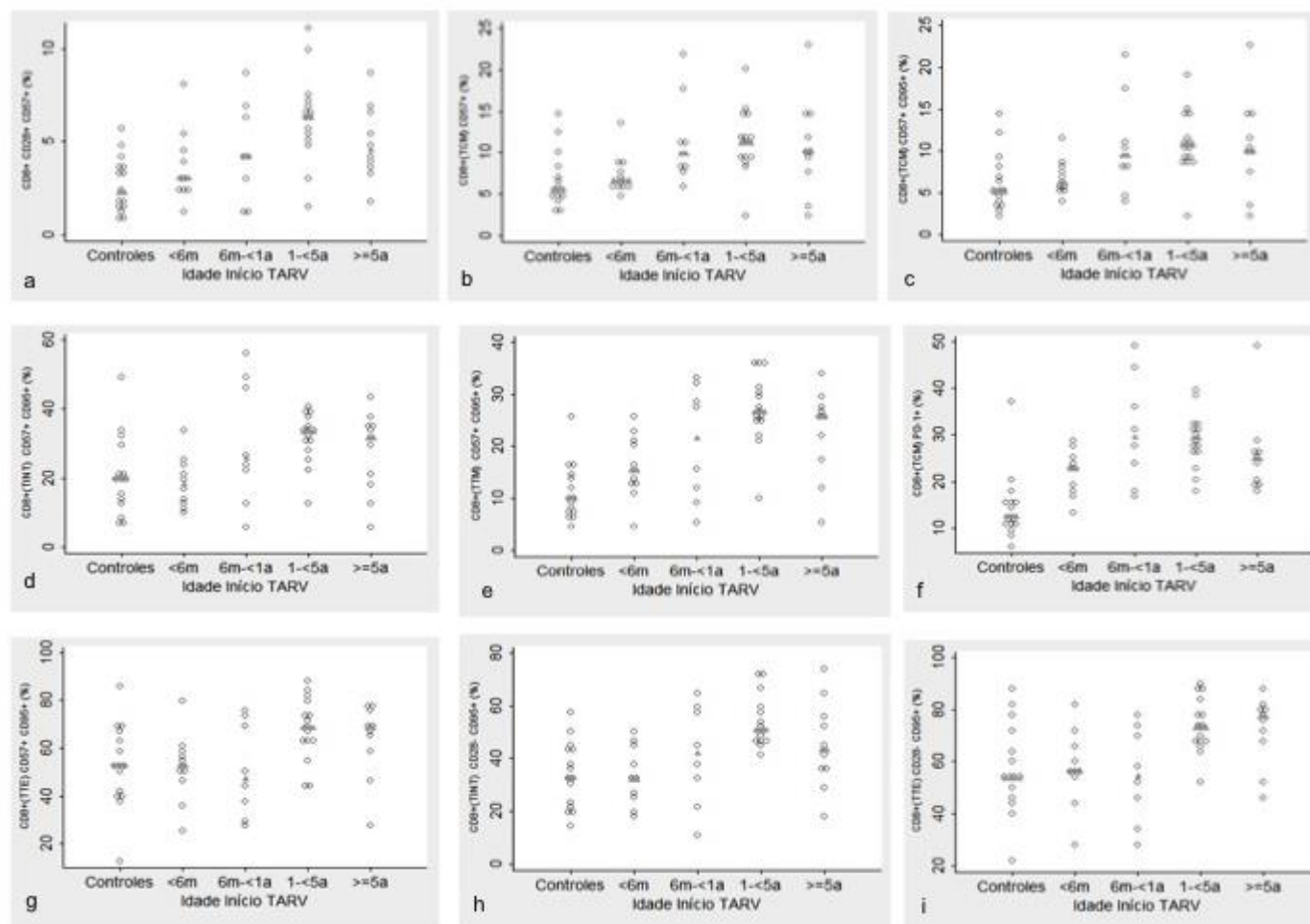
- » CD8+ naïve HLA- DR+ do que crianças iniciando TARV entre 6 meses e 1 ano ($p=0,041$) e após os 5 anos ($p=0,034$);
- » CD8+ naïve CD38+ CCR5+ do que crianças iniciando TARV entre 6 meses e 1 ano ($p=0,013$);
- » CD8+ naïve CD38+ HLA- DR+ do que crianças iniciando TARV entre 6 meses e 1 ano ($p=0,018$) e após os 5 anos ($p=0,002$);
- » CD8+ naïve CD38+ HLA- DR+ CCR5+ do que crianças iniciando TARV entre 6 meses e 1 ano ($p=0,032$);
- » CD8+ naïve CCR5+ do que crianças iniciando TARV entre 1 e 5 anos ($p=0,018$).
- de marcadores de apoptose, senescência e exaustão, do que crianças iniciando TARV entre 1 e 5 anos:
 - » CD8+ naïve CD95+ ($p=0,020$);
 - » CD8+ naïve CD57+ CD95+ ($p=0,026$);
 - » CD8+ naïve CD31+ CD57+ ($p=0,035$);
 - » CD8+ naïve CD31+ CD95+ ($p=0,031$);
 - » CD8+ naïve CD31+ PD-1+ CD57+ CD95+ ($p=0,015$).
- **Em LTCD8+ de memória central (TCM):**
- de marcadores de anergia (CD28-), senescência (CD57+), apoptose (CD95+) e exaustão (PD-1+):
 - » CD8+(TCM) CD28- CD57+ que crianças iniciando TARV entre 6 meses e 1 ano ($p=0,013$);
 - » CD8+(TCM) CD28- PD-1+ que crianças iniciando TARV entre 6 meses e 1 ano ($p=0,026$);
 - » CD8+(TCM) CD28- PD-1+ CD57+ que crianças iniciando TARV entre 6 meses e 1 ano ($p=0,008$);
 - » CD8+(TCM) PD-1+ CD57+ que crianças iniciando TARV entre 6 meses e 1 ano ($p=0,026$), entre 1 e 5 anos ($p=0,001$) e após os 5 anos ($p=0,034$);

-
- » CD8+(TCM) PD-1+ CD57+ CD95+ que crianças iniciando TARV entre 1 e 5 anos ($p=0,001$) e após os 5 anos ($p=0,028$);
 - » CD8+(TCM) CD57+ que crianças iniciando TARV entre 1 e 5 anos ($p=0,004$);
 - » CD8+(TCM) CD95+ (%) que crianças iniciando TARV entre 1 e 5 anos ($p=0,009$) e após os 5 anos ($p=0,023$);
 - » CD8+(TCM) PD-1+ (%) que crianças iniciando TARV entre 1 e 5 anos ($p=0,007$);
 - » CD8+(TCM) CD57+ CD95+ (%) que crianças iniciando TARV entre 1 e 5 anos ($p=0,003$);
 - » CD8+(TCM) CD31+ CD57+ (%) que crianças iniciando TARV entre 1 e 5 anos ($p=0,011$);
 - » CD8+(TCM) CD31+ CD95+ (%) que crianças iniciando TARV entre 1 e 5 anos ($p=0,007$) e após os 5 anos ($p=0,019$);
 - » CD8+(TCM) CD31+ PD-1+ (%) que crianças iniciando TARV entre 1 e 5 anos ($p=0,006$);
 - » CD8+(TCM) CD31+ PD-1+ CD57+ CD95+ (%) que crianças iniciando TARV entre 1 e 5 anos ($p=0,001$) e após os 5 anos ($p=0,019$).
 - de marcador de ativação (CCR5+) que crianças iniciando TARV entre 1 e 5 anos ($p=0,018$) e após os 5 anos ($p=0,013$).
 - Em **LTCD8+ de memória transitória (TTM)**, de marcadores de senescência, apoptose, e exaustão, que crianças iniciando TARV entre 1 e 5 anos:
 - » CD8+(TTM) CD57+ ($p=0,005$);
 - » CD8+(TTM) CD95+ ($p=0,000$);
 - » CD8+(TTM) PD-1+ ($p=0,006$);
 - » CD8+(TTM) CD28- PD-1+ ($p=0,017$);
 - » CD8+(TTM) CD28- PD-1+ CD57+ ($p=0,012$);

- » CD8+(TTM) CD31+ CD57+ ($p=0,007$);
 - » CD8+(TTM) CD31+ CD95+ ($p=0,001$);
 - » CD8+(TTM) CD31+ PD-1+ ($p=0,002$), também comparando-se com as crianças iniciando TARV após os 5 anos ($p=0,034$);
 - » CD8+(TTM) CD31+ PD-1+ CD57+ CD95+ ($p=0,001$); também comparando-se com as crianças iniciando TARV após os 5 anos ($p=0,049$);
 - » CD8+(TTM) CD57+ CD95+ ($p=0,001$);
 - » CD8+(TTM) PD-1+ CD57+ ($p=0,004$), também comparando-se com as crianças iniciando TARV após os 5 anos ($p=0,049$);
 - » CD8+(TTM) PD-1+ CD57+ CD95+ ($p=0,001$), também comparando-se com as crianças iniciando TARV após os 5 anos ($p=0,041$);
 - » CD8+(TTM) PD-1+ CD95+ ($p=0,001$), também comparando-se com as crianças iniciando TARV após os 5 anos ($p=0,034$).
- Em **LTCD8+ de memória intermediária (TINT)**, de marcadores de senescência, apoptose, e exaustão, em que crianças iniciando TARV entre 1 e 5 anos:
 - CD8+(TINT) CD57+ ($p=0,046$);
 - CD8+(TINT) CD95+ ($p=0,001$);
 - CD8+(TINT) CD28+ CD57+ ($p=0,023$);
 - CD8+(TINT) CD28- CD95+ ($p=0,000$);
 - CD8+(TINT) CD31+ CD57+ ($p=0,015$);
 - CD8+(TINT) CD31+ CD95+ ($p=0,003$);
 - CD8+(TINT) CD31+ PD-1+ CD57+ CD95+ ($p=0,005$);
 - CD8+(TINT) CD57+ CD95+ ($p=0,001$);
 - CD8+(TINT) PD-1+ CD57+ CD95+ ($p=0,008$);
 - CD8+(TINT) PD-1+ CD95+ ($p=0,011$).

- Em **LTCD8+ de memória efetora (TEM)**, de células CD8+(TEM) recém egressas do timo CD31+ que crianças iniciando TARV após os 5 anos ($p=0,030$); e de marcador de senescência (CD8+(TEM) CD28+ CD57+) que crianças iniciando TARV após os 5 anos ($p=0,043$).

- De **LTCD8+ de memória efetora terminal (TTE)** que crianças iniciando TARV após os 5 anos ($p=0,028$), e além disso, menores frequências de marcadores de apoptose, anergia, e senescência nesta subpopulação (LTCD8+ TTE) que crianças iniciando TARV entre 1 e 5 anos:
 - » CD8+ (TTE) CD95+ ($p=0,005$);
 - » CD8+ (TTE) CD28- CD95+ ($p=0,006$); também quando comparados às crianças iniciando TARV após os 5 anos ($p=0,049$);
 - » CD8+ (TTE) CD31+ CD95+ ($p=0,040$);
 - » CD8+ (TTE) CD57+ CD95+ ($p=0,013$).



a $p=0,027$; b $p=0,004$; c $p=0,003$; d $p=0,001$; e $p=0,001$; f $p=0,007$; g $p=0,013$; h $p=0,000$; i $p=0,06$ (também vs crianças iniciando TARV>5a, $p=0,049$).

Figura 14. LTCD8+ com marcadores de apoptose (CD95+), de exaustão (PD-1+) e de senescência (CD57+) nas crianças incluídas no estudo: crianças iniciando TARV <6m tem menores frequências destes marcadores do que crianças iniciando TARV entre 1 e 5 a.

Também foi de interesse investigar as diferenças no grupo das crianças iniciando TARV entre 6 meses e 1 ano de idade. Este grupo apresentou menores frequências:

- Em **LTCD8+ total**:
 - de marcador de exaustão CD8+ CD28+ PD-1+ do que crianças iniciando TARV entre 1 e 5 anos ($p=0,039$);
 - de marcador de apoptose CD8+ CD95+ do que crianças iniciando TARV entre 1 e 5 anos ($p=0,049$);
 - de células recém egressas do timo CD8+ CD31+ do que crianças iniciando TARV entre 6 meses e 1 ano ($p=0,041$).
- Em **LTCD8+ naïve**, de marcadores de apoptose, senescência e exaustão do que crianças iniciando TARV entre 1 e 5 anos: CD8+ naïve CD31+ PD-1+ CD57+ CD95+ ($p=0,020$); CD8+ naïve CD31+ CD95+ ($p=0,039$).
- Em **LTCD8+ de memória intermediária (TINT)**, de marcador de ativação, CD8+(TINT) HLA- DR+ ($p=0,045$) do que crianças iniciando TARV entre 1 e 5 anos.
- Totais de **LTCD8+ de memória central (TCM)** do que crianças iniciando TARV entre 1 e 5 anos ($p=0,017$; $p=0,028$).
- Em **LTCD8+ de memória efetora terminal (TTE)**, de marcadores de apoptose e anergia: CD8+(TTE) CD95+ do que crianças iniciando TARV entre 1 e 5 anos ($p=0,024$) e após os 5 anos ($p=0,041$); CD8+(TTE) CD28- CD95+ do que crianças iniciando TARV entre 1 e 5 anos ($p=0,039$) e após os 5 anos ($p=0,033$). Na mesma subpopulação porém de LTCD8+(TTE), crianças iniciando TARV entre 6 meses e 1 ano apresentaram *maiores* frequências de marcadores de exaustão e também anergia do que crianças iniciando TARV entre 1 e 5 anos: CD8+(TTE) PD-1+ ($p=0,008$); CD8+(TTE) CD28- PD-1+ ($p=0,012$); CD8+(TTE) PD-1+ CD57+ ($p=0,010$).

Surpreendentemente, crianças iniciando TARV entre 6 meses e 1 ano tiveram maiores frequências, em **LTCD8+ de memória central (TCM)** de marcadores de ativação:

- » CD8+(TCM) CD38+ que crianças iniciando TARV entre 1 e 5 anos ($p=0,010$) e após os 5 anos ($p=0,011$) ;
- » CD8+(TCM) HLA- DR+ que crianças iniciando TARV entre 1 e 5 anos ($p=0,033$) e após os 5 anos ($p=0,041$) ;
- » CD8+(TCM) CD38+ HLA- DR+ que crianças iniciando TARV entre 1 e 5 anos ($p=0,039$) e após os 5 anos ($p=0,041$).

Levando-se em consideração as análises de comparação entre os grupos estratificados conforme a idade de início de TARV – e corroborando os achados das correlações idade de início de TARV e marcadores - em diversas subpopulações de LTCD8+ os grupos de crianças que iniciaram a TARV de forma mais precoce, em particular antes dos 6 meses de idade, tinham de forma geral menores frequências de marcadores que estão associados com senescência, exaustão, anergia e apoptose, com algumas exceções. Por exemplo uma exceção a esta observação seria o achado de alguns marcadores de anergia, exaustão e apoptose em LTCD8+ de memória efetora terminal (TTE), terem sido encontrados em maior frequência no grupo que iniciou TARV entre 6 meses e 1 ano. Marcadores de ativação foram encontrados em LTCD8+ totais, naïve e em LTCD8+ efetores (TINT) em menor frequência nas crianças iniciando TARV antes dos 6 meses, porém apareceram em *maior* frequência em LTCD8+ de memória central (TCM) nas crianças iniciando TARV entre 6 meses e 1 ano. Nas demais subpopulações os marcadores de ativação aqui estudados não apareceram de forma significativamente diferente entre os grupos.

4.8 Sorologias vacinais e marcadores de senescência, apoptose, exaustão e ativação em LTCD4+ e LTCD8+

Procurou-se a seguir investigar como os mesmos marcadores de ativação, senescência, e exaustão do sistema imune celular se relacionavam com os títulos de resposta vacinal para os quatro antígenos estudados - Hepatite B, Hepatite A, Rubéola e Caxumba, e adicionalmente, como se comportavam nas crianças imunes vs. não imunes para cada uma das doenças. Além disso foi de nosso interesse estudar como as proporções de subpopulações linfocitárias (LTCD4+ e LTCD8+) se relacionavam com as sorologias vacinais. Os achados serão descritos a seguir detalhando a relação entre proporções linfocitárias, marcadores e resposta vacinal para cada uma das doenças.

- Hepatite B

Quando examinada a correlação entre títulos anti-HBs (UI/L) e os diversos marcadores estudados, apresentaram correlação positiva com títulos os marcadores relacionados a senescência (CD57+), apoptose (CD95+) e exaustão (PD1+) em LTCD4+ de memória central (TCM) e LTCD4+ efetoras (TTM) recém egressos do timo (CD31+). Surpreendentemente, apresentou correlação negativa com títulos anti-HBs a subpopulação de LTCD4+ naíve com marcador de ativação (HLA-DR). Entre estas subpopulações de LTCD4+ de memória central (TCM) e LTCD4+ efetoras (TTM) recém egressos do timo (CD31+), em particular os *LTCD4+ (TTM) CD31+ CD57+* e *LTCD4+(TTM) CD31+ PD-1+ CD57+ CD95+* tinham maiores frequências nas crianças não imunes à Hepatite B, definidas como aquelas que não apresentavam, à inclusão no estudo, títulos anti-HBs ≥ 10 UI/L. Outras subpopulações com menor frequência em crianças imunes foram aquelas de LTCD4+ efetores (TINT, TTM), inclusive recém egressos do timo (CD31+), com marcadores que indicavam apoptose (CD95+) e exaustão (PD1+). Por outro lado, marcadores de ativação celular (HLA-DR, CCR5, CD38) em células efetoras (TINT) foram encontrados de forma mais frequente em imunes.

Similarmente ao encontrado nas subpopulações linfocitárias CD4+, em LTCD8+ marcadores de senescência (CD57+), exaustão (PD-1) e apoptose (CD95+)

em células de memória efetora (TEM) e células naïve, inclusive em LTCD8+ (TEM) e naïve recém egressos do timo (CD31+), estavam relacionados com menores títulos de proteção para a Hepatite B – correlação positiva. As mesmas subpopulações de LTCD8+ com marcadores que indicavam senescência em LTCD8+ naïve, inclusive em células recém egressas do timo (CD31+), tinham menores frequências em imunes quando examinadas as diferenças entre os grupos (imunes vs. não imunes). De forma análoga, as mesmas subpopulações de LTCD8+ (TEM) recém egressos do timo (CD31+) com marcadores de apoptose (CD95+), senescência (CD57+) e exaustão (PD1+), tinham menores frequências em crianças imunes para a Hepatite B. Adicionalmente, a frequência da subpopulação de LTCD8+ de memória central (TCM) era menor nas crianças imunes, assim como marcadores de anergia (CD28-) e apoptose (CD95) na mesma subpopulação (TCM) eram também menos frequentes em imunes. Surpreendentemente, marcadores de ativação (HLA-DR, CD38, CCR5) em LTCD8+ de memória central (TCM) e efetora (TEM) estavam associados com mais títulos anti-HBs – correlação negativa. De forma análoga, marcadores de ativação (HLA-DR, CCR5, CD38) em LTCD8+ totais, de memória central e efetoras (TEM, TINT, TTM) foram encontrados com maior frequência em crianças imunes para a Hepatite B (Figura 15).

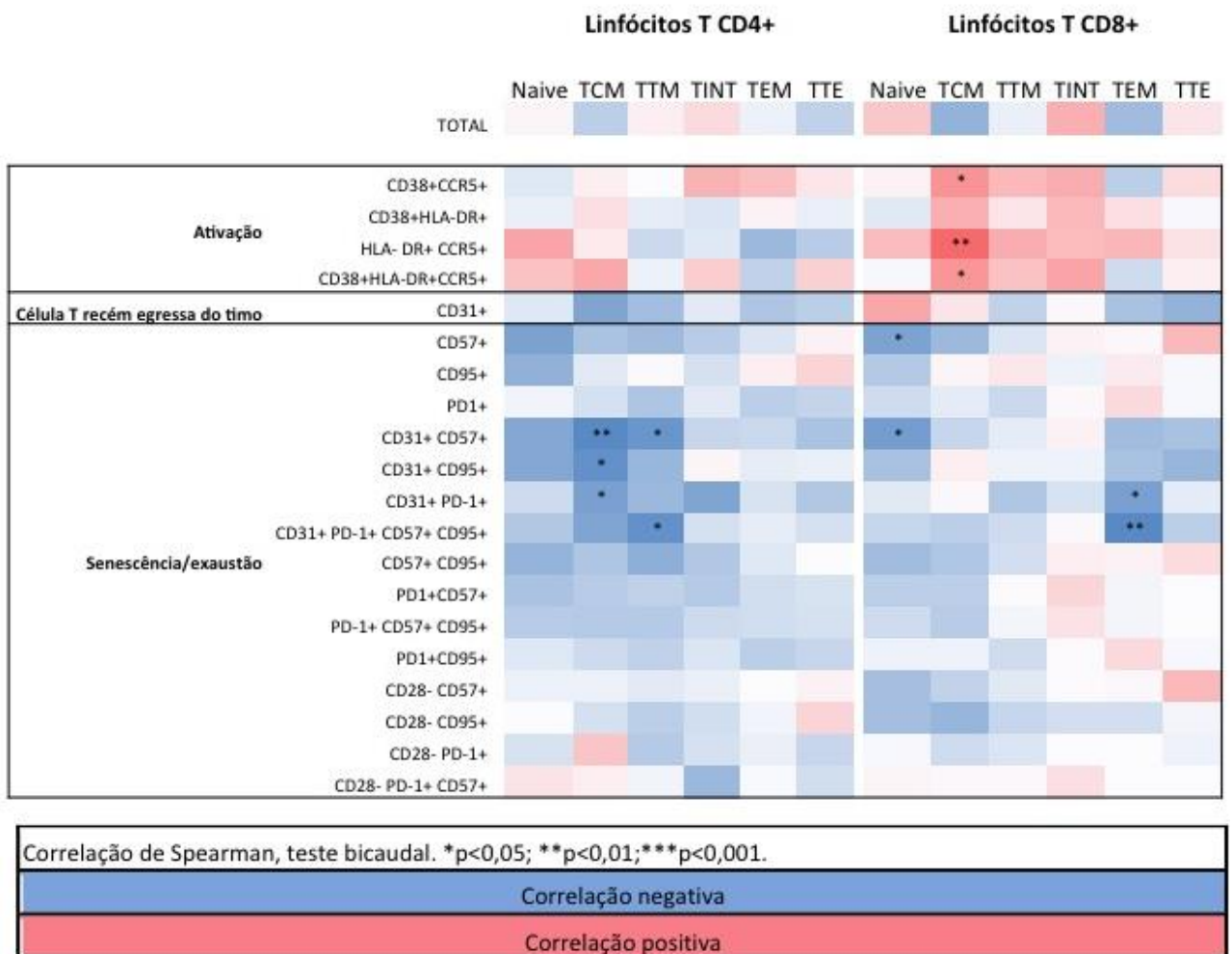


Figura 15. Heat Map de correlações entre títulos de proteção para Hepatite B e marcadores de senescência, apoptose, exaustão, anergia e ativação nas subpopulações de LTCD4+ e LTCD8+.

- Hepatite A

Quando explorada a correlação entre anticorpos totais para a Hepatite A e marcadores de interesse em LTCD4+ das crianças incluídas, a maior frequência de células recém egressas do timo (CD31+) em LTCD4+ totais, assim como LTCD4+ totais com marcador de menor diferenciação (CD45RA+) e LTCD4+ de perfil intermediário (TINT) estiveram relacionados com maiores títulos de proteção para a Hepatite A – correlação positiva. Surpreendentemente também tiveram correlação

positiva com títulos LTCD4+ totais com dupla marcação de anergia (CD28-) e senescência (CD57+). LTCD4+ de memória efetora (TEM) com dupla marcação de anergia (CD28-) e apoptose (CD95+) também estavam relacionados com maiores títulos para Hepatite A, porém em subpopulação menos diferenciada (CD28+) de LTCD4+ (TEM), o marcador de apoptose (CD95+) estava relacionado com menores títulos. De forma análoga, LTCD4+ de memória central (TCM) marcados com CD95+ estavam relacionados com menores título para Hepatite A – correlação negativa. Também surpreendentemente, a frequência da subpopulação de LTCD4+ de memória transitória (TTM) diferenciada (CD28-) e com dupla marcação de exaustão e senescência (PD-1+ CD57+) estava correlacionada de forma positiva com títulos para Hepatite A. Algumas destas subpopulações que tiveram correlação positiva com títulos – *LTCD4+ CD28- CD57+* e *LTCD4+ (TTM) CD28- PD-1+ CD57+* - foram encontradas em maiores frequências em crianças imunes para a Hepatite A (i.e, com anticorpos totais para a Hepatite A ≥ 20 UI/L) do que nas crianças não imunes. Também surpreendentemente, marcadores de senescência (CD57+), apoptose (CD95+), e anergia (CD28-) em LTCD4+ de resposta efetora terminal (TTE) tinham menores frequências em crianças imunes. Outras subpopulações encontradas em menor frequência em imunes foram: o maior percentual de linfócitos totais, e LTCD4+ de perfil precursor (naïve CD28+) e de perfil intermediário (TINT). O marcador de ativação (CD38+), tanto em LTCD4+ total quanto em LTCD4+ naïve, foi encontrado em menor frequência em imunes para a Hepatite A, assim como marcadores de senescência (CD57+), apoptose (CD95+), e exaustão (PD-1+), em diversas combinações, e em LTCD4+ de memória central (TCM) e resposta efetora transitória (TTM), inclusive recém egressos do timo (CD31+).

Examinando-se as correlações entre as subpopulações de LTCD8+ e seus marcadores, e títulos para a Hepatite A, a maior frequência de marcador associado a apoptose (CD95+) em LTCD8+ total, naïve e efector terminal (TTE) esteve relacionada a menores títulos para Hepatite A – correlação negativa. Marcadores de anergia (CD28-), senescência (CD57+), e exaustão (PD-1+) em LTCD8+ naïve, inclusive em células recém egressas do timo, também estiveram relacionados a menos títulos de proteção contra a Hepatite A, assim como marcadores de ativação (CD38+, HLA-DR, CCR5+), em LTCD8+ naïve e de memória efetora (TEM). Também tiveram, entretanto, correlação negativa com títulos as subpopulações de LTCD8+ de memória central (TCM) e transitória (TTM). O marcador de menor diferenciação (CD45RA+) em LTCD8+ total estava relacionado com maiores títulos de anticorpos totais para a

Hepatite A. De maneira semelhante ao encontrado em LTCD4+, também em LTCD8+ o maior percentual de linfócitos totais e de perfil precursor (LTCD8+ naïve CD28+) tiveram maiores frequências em imunes para a Hepatite A, assim como marcadores de senescência (CD57+), apoptose (CD95+), e exaustão (PD-1+), em diversas combinações, em LTCD8+ de memória central (TCM) e resposta efetora transitória (TTM), inclusive LTCD8+ (TCM) recém egressos do timo (CD31+), tiveram menores frequências em crianças imunes. Além disso, marcador de senescência em LTCD8+ total, de apoptose (CD95+) em LTCD8+ de memória efetora terminal (TTE), e de senescência (CD57+), apoptose (CD95+), anergia (CD28-) e exaustão (PD-1+) em LTCD8+ naïve, inclusive recém egressos do timo (CD31+), tiveram menores frequências em imunes. Finalmente, e consistente com o que foi encontrado na análise de correlações entre subpopulações de LTCD8+ e seus marcadores, e títulos para a Hepatite A descrita acima, marcadores de ativação (CD38+, HLA-DR, CCR5+) em LTCD8+ naïve e de memória efetora (TEM) foram mais encontrados nas crianças não imunes (Figura 16).

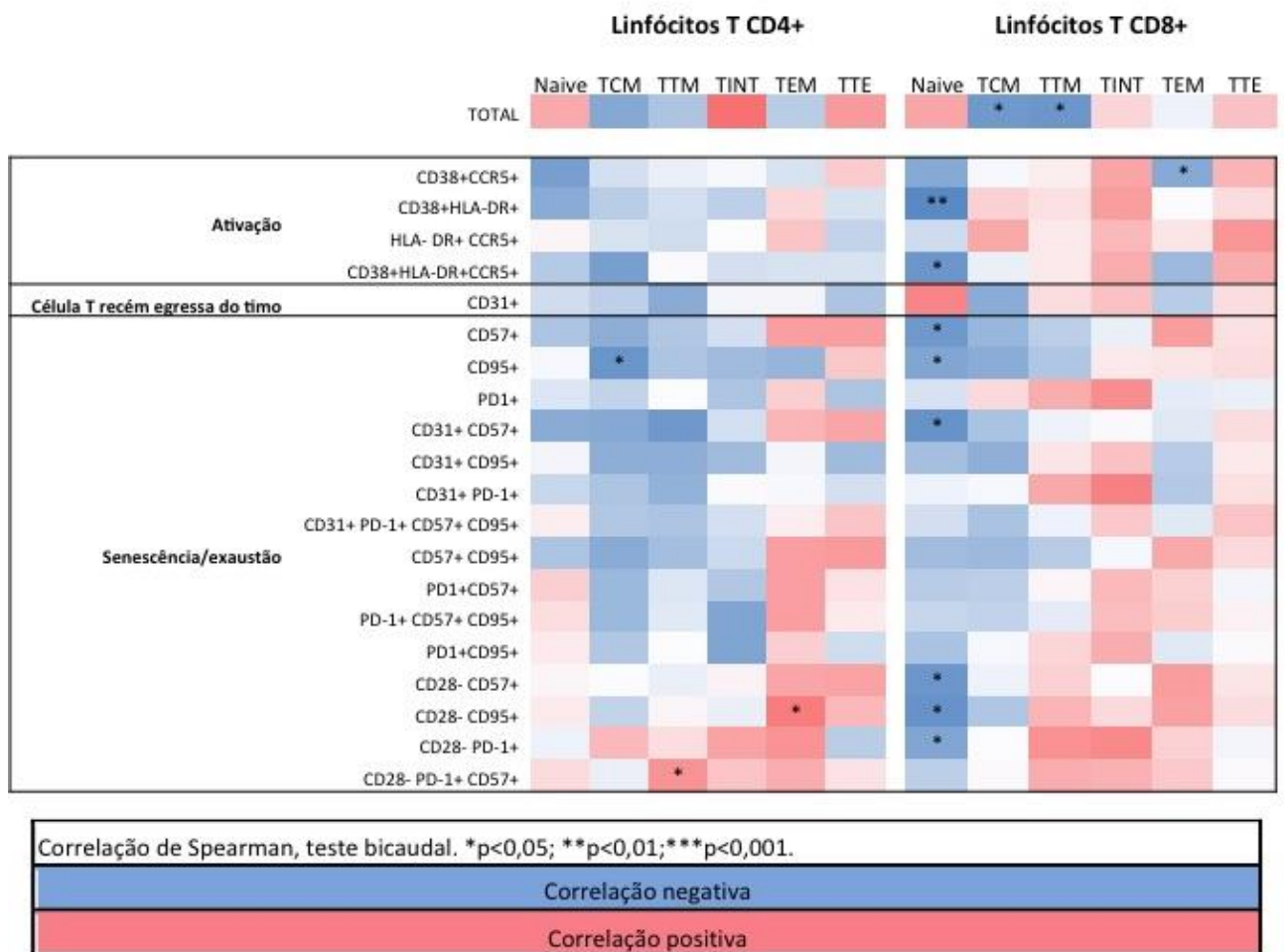


Figura 16. Heat Map de correlações entre títulos de proteção para Hepatite A e marcadores de senescência, apoptose, exaustão, anergia e ativação nas subpopulações de LTCD4+ e LTCD8+.

- Rubéola

As subpopulações de LTCD4+ de memória central (TCM) e efetora (TEM) tiveram correlação negativa com títulos de proteção para a Rubéola. A subpopulação de LTCD4+ naïve porém, teve correlação positiva com títulos. Em relação aos títulos de proteção contra a Rubéola e sua correlação com marcadores de interesse nas várias subpopulações de LTCD4+ estudadas, de forma consistente marcadores de diferenciação(45RA-), apoptose (CD95+), senescência (CD57+) e exaustão (PD1+)

em LTCD4+ totais, naïve, e de memória efetora (TEM, TINT, TTM, TTE) estiveram relacionados com menores títulos de IgG anti Rubéola – correlação negativa. Marcadores de apoptose (CD95+) em LTCD4+ de memória central (TCM) também estiveram relacionados com menores títulos, assim como marcadores de apoptose (CD95+), senescência (CD57+) e exaustão (PD1+) em LTCD4+ totais, naïve, de memória intermediária (TINT) e transitória (TTM) recém egressas do timo (CD31+). Marcadores de menor diferenciação (CD45RA+, CD27+) e células precursoras (LTCD4+ naïve) estiveram relacionados com maiores títulos. Como exceção, marcadores de senescência (CD57+) e anergia (CD28-) em células de memória transitória (*LTCD4+TTM CD28- CD57+*) estiveram relacionados a maiores títulos – correlação positiva. Também surpreendentemente, o marcador de ativação (CD38+) em LTCD4+ efetores terminais (TTE) esteve associado a mais títulos. Outros marcadores de ativação nas demais subpopulações de LTCD4+ não tiveram correlação com resposta à Rubéola estatisticamente significativa. Esta mesma subpopulação de resposta efetora terminal marcada com CD38+: *LTCD4+ (TTE) CD38+* foi encontrada em maiores proporções no grupo das crianças imunes (IgG anti-Rubéola ≥ 10 UI/ml). Este marcador de ativação (CD38+) e outros (HLA-DR, CCR5+) em LTCD4+ de memória efetora intermediária e terminal (TINT, TTE) tiveram maior frequências em crianças imunes. Também surpreendentemente, marcadores de anergia (CD28-) e senescência (CD57+) em LTCD4+ de memória transitória (TTM) tiveram maiores frequências em imunes. Consistente, porém, com o que foi encontrado na análise das correlações entre subpopulações marcadas e títulos, marcadores de anergia (CD28-), senescência (CD57+), apoptose (CD95) e exaustão (PD-1+), em diversas combinações, em LTCD4+ totais, naïve e de memória central e efetora (TINT, TEM, TTE), inclusive em subpopulações recém egressas do timo (CD31+), tiveram menores frequências em imunes. Digno de nota, porém, os totais das subpopulações de memória central (TCM) e de memória efetora (TEM) e efetora terminal (TTE) tinham também menores frequências em imunes. Em contraste, a frequência da subpopulação de LTCD4+ naïve era maior em imunes para a Rubéola.

Nas crianças do estudo o maior percentual de LTCD8+ estava associado com títulos mais baixos para a Rubéola. De forma semelhante ao observado nas subpopulações de LTCD4+, nas subpopulações de LTCD8+ marcadores de anergia (CD28-), apoptose (CD95+), senescência (CD57+) e exaustão (PD-1+), em diversas combinações, em LTCD8+ totais, inclusive em células recém egressas do timo, estavam correlacionados com menos títulos de proteção contra a Rubéola – correlação

negativa. Vários destes marcadores nas subpopulações de LTCD8+ naïve, de memória central (TCM), de memória intermediária (TINT) e transitória (TTM), inclusive recém egressos do timo (CD31+), também tiveram correlação negativa com títulos, assim como em LTCD8+ de memória efetora (TEM) e efetora terminal (TTE). Marcadores de ativação (CD38+, CCR5+, HLA-DR+) em LTCD8+ totais, de memória central e células efectoras (TTM, TTE) por sua vez, de maneira geral estiveram associados com *mais* títulos para a Rubéola, com exceção da subpopulação de LTCD8+ de memória intermediária (TINT) marcada com HLA-DR+ e a subpopulação de LTCD8+ de memória central (TCM) com marcador CCR5+, que estiveram negativamente correlacionados com títulos. De forma análoga, os mesmos marcadores de ativação (CD38+, HLA-DR, CCR5+) tiveram maiores frequências em LTCD8+ totais, de memória central (TCM) e de memória intermediária (TINT) e transitória (TTM) em crianças imunes para Rubéola. Também confirmando os achados da análise das correlações entre subpopulações e títulos, marcadores de apoptose (CD95) e exaustão (PD-1+) em LTCD8+ total inclusive recém egressos do timo (CD31+), tiveram menores frequências em crianças imunes. De forma análoga, marcadores de anergia (CD28-), senescência (CD57+), apoptose (CD95) e exaustão (PD-1+), em LTCD8+ naïve e em LTCD8+ de memória intermediária (TINT) tiveram menores frequências em imunes, inclusive em LTCD8+ naïve e LTCD8+ (TINT) recém egressos do timo. Marcadores sugestivos de apoptose (CD95+) e de exaustão (PD-1+) em LTCD8+ de memória transitória (TTM) também foram encontrados em menores frequências em crianças imunes, inclusive em LTCD8+ (TTM) recém egressos do timo (Figura 17).

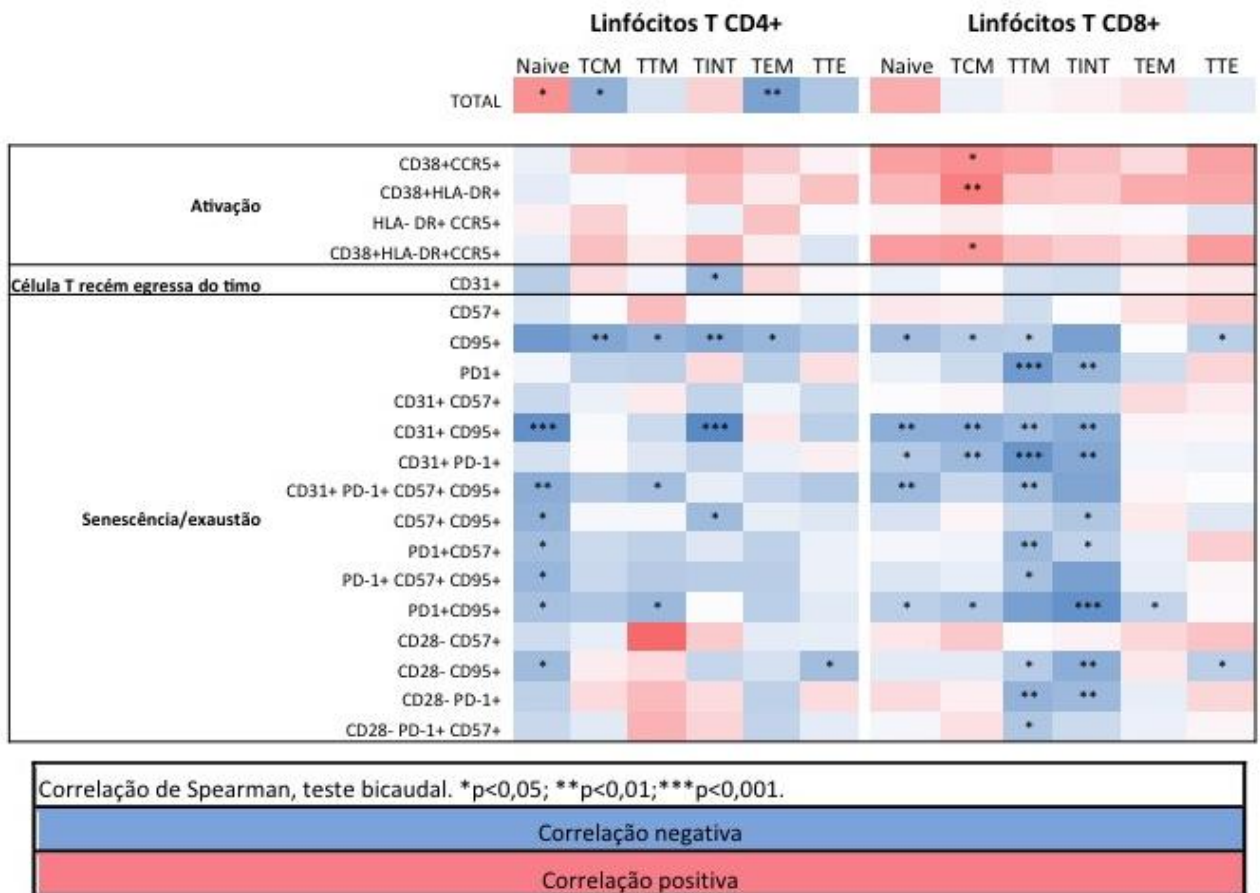


Figura 17. Heat Map de correlações entre títulos de proteção para Rubéola e marcadores de senescência, apoptose, exaustão, anergia e ativação nas subpopulações de LTCD4+ e LTCD8+.

- Caxumba

Quando analisadas as correlações entre títulos de proteção contra a Caxumba e os marcadores de interesse nas várias subpopulações linfocitárias, se correlacionaram com títulos mais baixos marcadores de anergia (CD28-), exaustão (PD-1+), senescência (CD57+) apoptose (CD95+) em LTCD4+ de memória efetora (TEM), em diversas combinações – correlação negativa. O marcador de exaustão (PD-1+) em LTCD4+ de memória intermediária (TINT) recém egressos do timo (CD31+)

também apareceram com correlação negativa com títulos. Surpreendentemente, a maior frequência de LTCD4+ naíve recém egressos do timo (CD31+) estava relacionada com menores títulos de IgG anti-Caxumba. Nenhum marcador de ativação celular nas subpopulações de LTCD4+ se correlacionou de forma estatisticamente significativa com títulos anti-Caxumba. Analisando-se as diferenças entre os grupos de crianças imunes, ou respondedoras à Caxumba (IgG anti Caxumba $\geq 11,0$ UA/ml) e não imunes, marcadores de anergia (CD28-), apoptose (CD95), ativação (CD38+, HLA-DR) e exaustão (PD-1+) em LTCD4+ totais tiveram menores frequências em imunes. Outras subpopulações com menores frequências em crianças imunes incluem: LTCD4+ naíve recém egressos do timo (CD31+) e LTCD4+ naíve -inclusive recém egressos do timo (CD31+)- com marcadores de apoptose (CD95+), ativação (CD38+, HLA-DR, CCR5+), senescência (CD57+) e exaustão (PD-1+); LTCD4+ de memória intermediária (TINT) com marcador de ativação (HLA-DR+ CCR5+), e, finalmente, LTCD4+ de memória efetora (TEM) com marcadores de anergia (CD28-), apoptose (CD95), senescência (CD57+) e exaustão (PD-1+).

Na análise das correlações envolvendo LTCD8+, uma das subpopulações de perfil precursor (LTCD8+ naíve CD28+) estava surpreendentemente correlacionada com menores títulos de proteção contra a Caxumba – correlação negativa. Subpopulações que estavam correlacionadas também com menores títulos incluem: LTCD8+ de memória central (TCM) com marcador de exaustão (PD-1+), LTCD8+ de memória transitória (TTM) com marcadores de exaustão (PD-1+) e anergia (CD28-), inclusive em LTCD8+ (TTM) recém egressos do timo (CD31+), e LTCD8+ de memória intermediária (TINT) com marcadores de exaustão (PD-1+) e anergia (CD28-). LTCD8+ (TINT) com marcador de ativação celular (CCR5+) estava, entretanto, correlacionado com maiores títulos anti-Caxumba. Quando investigadas as diferenças de subpopulações de LTCD8+ nos grupos imunes à Caxumba vs. não imunes, as crianças imunes ou respondedoras apresentavam menores frequências de LTCD8+ total. A subpopulação de LTCD8+ recém egressos do timo com marcador sugestivo de apoptose (CD95+) também apresentou correlação negativa com títulos, assim como subpopulações de memória efetora (TEM, TINT, TTE) apresentando marcadores de ativação (CD38+, HLA-DR, CCR5+). Como exceção, observou-se que a subpopulação de LTCD8+ de memória efetora terminal (TTE) marcada com CD38+ tinha maior frequência nas crianças imunes. Finalmente, marcadores de apoptose (CD95+) e exaustão (PD-1+) em LTCD8+ efetores (TINT, TTM)- inclusive recém egressos do timo (CD31+), tiveram menores frequências em imunes.

Em resumo, para as 4 doenças imunopreveníveis aqui estudadas, marcadores de anergia (CD28-), senescência (CD57+), apoptose (CD95+) e exaustão (PD1+), em diferentes subpopulações de LTCD4+ e LTCD8+ estiveram, com algumas exceções, mais frequentemente relacionados com menores títulos de proteção, e comumente encontrados em menores frequências em crianças imunes. Marcadores de ativação celular (CD38+, CCR5+, HLA-DR+) em LTCD4+ e LTCD8+ apresentaram um perfil mais variável segundo o antígeno. No caso de proteção para a Hepatite B, marcadores de ativação em LTCD4+, mas principalmente LTCD8+ precursores e efetores frequentemente se correlacionavam de maneira positiva com títulos, e essas subpopulações tinham maiores frequências em crianças respondedoras. Diferentemente da Hepatite B, para a Hepatite A, subpopulações de LTCD8+ precursoras e efetoras com marcadores de ativação tiveram menores frequências em crianças respondedoras, e a subpopulação de LTCD4+ total marcada com CD38+ teve menor frequência em crianças imunes. Em relação à Rubéola, em uma subpopulação de LTCD4+ efetor com marcador de ativação (LTCD4+ TTE CD38+) se correlacionava de forma positiva com títulos, e subpopulações efetoras de LTCD4+(TINT, TTE) com marcadores de ativação eram mais frequentes em crianças imunes; e em LTCD8+ totais, de memória central e efetora se correlacionavam de forma também positiva com títulos, e eram mais frequentes em crianças imunes. Finalmente, quanto à resposta à Caxumba, em geral marcadores de ativação em LTCD4+ total, naïve e efetores, tinham menor frequência nas crianças imunes; em LTCD8+ uma subpopulação de memória intermediária (TINT) marcada com CCR5+ tinha correlação positiva com títulos, enquanto que outras subpopulações de LTCD8+ efetores com marcadores de ativação foram menos frequentes nas crianças imunes, com exceção de uma subpopulação (LTCD8+ TTE CD8+), que teve maior frequência nas crianças imunes (Figura 18).

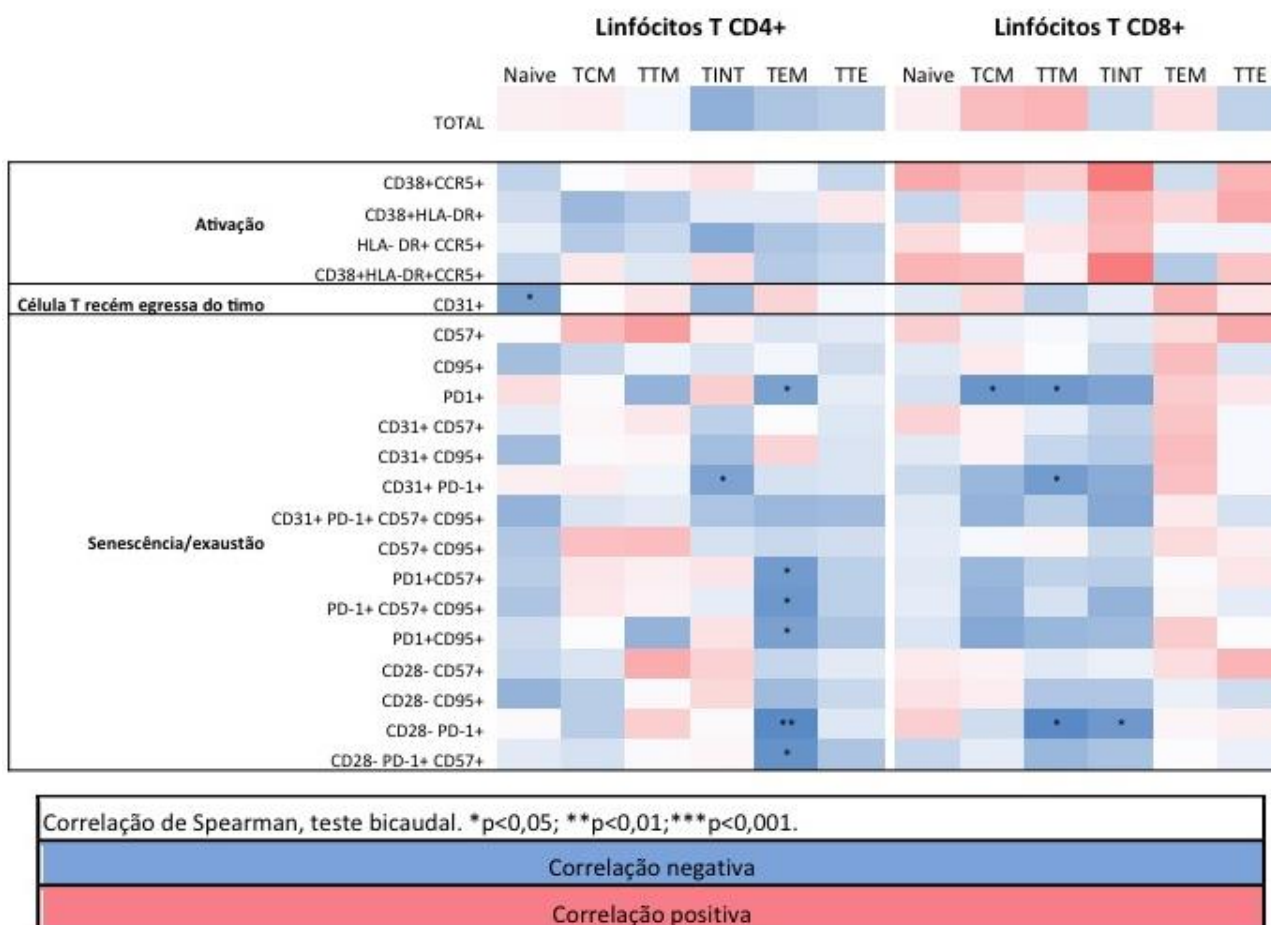


Figura 18. Heat Map de correlações entre títulos de proteção para Caxumba e marcadores de senescência, apoptose, exaustão, anergia e ativação nas subpopulações de LTCD4+ e LTCD8+.

4.9 Treg e marcadores de senescência, apoptose, exaustão e ativação em LTCD4+ e LTCD8+

Com o objetivo de completar a análise do sistema imune no que tangia às células T das crianças incluídas no estudo, foi explorado o perfil das células T reguladoras (Treg). Não foi encontrada diferença de frequência de Treg nos grupos estratificados segundo a idade de início de TARV. Quando examinada a correlação entre idade de início de TARV e % Treg, o início mais precoce da TARV estava

correlacionado com maiores frequências de Treg na inclusão no estudo (correlação de Spearman, $\rho=-0,33$; $p=0,034$). As frequências de Treg não foram diferentes nos grupos de crianças imunes e não imunes para cada uma das doenças estudadas (Hepatite B, Hepatite A, Rubéola e Caxumba).

Em seguida procurou-se saber como as Treg se relacionavam com os marcadores de interesse deste estudo. A Figura 19 detalha as correlações estatisticamente significantes entre marcadores e %Treg. Na subpopulação de LTCD4+, houve correlação positiva entre a %Treg e marcadores de senescência (CD57+), apoptose (CD95+) e exaustão (PD-1+) em LTCD4+ total e efetores (TEM, TINT), inclusive em LCD4+ total e de memória efetora (TEM) recém egressos do timo (CD31+). A subpopulação de LTCD4+ naïve se correlacionou negativamente com %Treg, porém houve correlação positiva entre %Treg e marcadores de ativação (CCR5+, HLA-DR) nesta subpopulação. Também houve correlação positiva entre %Treg e a subpopulação de LTCD4+ de memória transitória (TTM), mas negativa entre %Treg e a subpopulação de LTCD4+ de memória intermediária (TINT), inclusive marcada com marcadores de exaustão (PD-1+) e anergia (CD28-).

Na subpopulação de LTCD8+, houve correlação positiva entre %Treg e marcadores de apoptose (CD95+) e exaustão (PD-1+) em LTCD8+ total, inclusive em células recém egressas do timo (CD31+), assim como entre %Treg e marcador de apoptose (CD95+) em LTCD8+ efetores (TINT, TTE) recém egressos do timo (CD31+). Também houve correlação positiva entre %Treg e subpopulações de LTCD8+ de memória central (TCM) e de memória transitória (TTM). Finalmente, houve correlação negativa entre %Treg e LTCD8+ de memória intermediária (TINT).

Marcadores	Treg (%)	Marcadores	Treg (%)
CD4+ CD57+ (%)	*	CD4+(TINT) CD28+ CD95+ (%)	*
CD4+ CD95+ (%)	*	CD4+(TINT) CD28- PD-1+ (%)	*
CD4+ PD-1+ (%)	*	CD4+(TINT) HLA- DR+ CCR5+ (%)	*
CD4+ CD28+ CD57+ (%)	*	CD4+ naïve CD28- CD95+ (%)	*
CD4+ CD28+ PD-1+ (%)	*	CD4+ naïve HLA- DR+ CCR5+ (%)	*
CD4+ CD31+ CD57+ (%)	*	CD8+ CD28+ CD95+ (%)	*
CD4+ CD31+ CD95+ (%)	**	CD8+ CD31+ CD95+ (%)	*
CD4+ CD31+ PD-1+ (%)	*	CD8+ CD31+ PD-1+ (%)	*
CD4+ CD31+ PD-1+ CD57+ CD95+ (%)	*	CD8+(TINT) CD31+ CD95+ (%)	*
CD4+ CD57+ CD95+ (%)	*	CD8+(TTE) CD31+ (%)	*
CD4+ PD-1+ CD57+ (%)	*	CD8+(TTE) CD31+ CD95+ (%)	**
CD4+ PD-1+ CD57+ CD95+ (%)	*	CD4+(TTM) (%)	*
CD4+ PD-1+ CD95+ (%)	*	CD4+ naïve (%)	*
CD4+(TEM) CD31+ CD57+ (%)	*	CD8+(TCM) (%)	**
CD4+(TEM) CD31+ PD-1+ (%)	*	CD8+(TTM) (%)	*
Correlação de Spearman, teste bicaudal. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.			
Correlação negativa			
Correlação positiva			

Figura 19. Heat Map de correlações estatisticamente significantes entre marcadores de ativação e maturação de LTCD4+ e LTCD8+ e %Treg.

5. Discussão

5.1 TARV precoce e a preservação de LTCD4+ e da razão LTCD4+/LTCD8+

O objetivo deste estudo foi de explorar a idade de início da TARV e diferentes desfechos relativos ao funcionamento do sistema imune de crianças perinatalmente infectadas pelo HIV e em supressão viral. Estudos prévios já demonstraram o efeito da TARV iniciada mais precocemente no reestabelecimento mais expressivo de contagens de LTCD4+ nas crianças infectadas pelo HIV ⁷⁴⁻⁷⁶. Van Dyke RB et al, analisando dados oriundos de múltiplos centros seguindo crianças infectadas pelo HIV perinatalmente demonstraram que LTCD4+ nadir mais alto e idade mais precoce de início de TARV eram preditores independentes de LTCD4+ mais altos na altura da análise do estudo, uma média de 11 anos após o início de TARV ¹⁰⁴. Corroborando com a evidência neste sentido, dados clínicos destas duas coortes de crianças por nós estudadas demonstraram que a TARV instituída mais precocemente preservou o pool de LTCD4+ das crianças anos após o início da terapia: a idade mais precoce de início de TARV esteve correlacionada com contagens de LTCD4+ absoluto e % na inclusão mais altos; e crianças que iniciaram TARV antes dos 6 meses de idade apresentaram níveis de LTCD4+ absolutos maiores quando comparadas às crianças que iniciaram TARV entre 1 e 5 anos e após os 5 anos de idade, denotando benefício inclusive quando a TARV foi iniciada antes dos 6 meses de idade, uma janela relativamente curta para uma intervenção como a do início da TARV. Outros achados que corroboraram com a preservação de LTCD4+ e sugerem uma menor depleção do sistema imune associada à TARV mais precoce se referem à preservação de Nadir de LTCD4+ com o início mais precoce da TARV, também com benefício quando a TARV foi iniciada antes dos 6 meses de vida.

A razão LTCD4+/LTCD8+ vem sendo reconhecida como importante marcador de progressão da doença pelo HIV, principalmente por estar associada, quando baixa ou invertida (<1), a maior mortalidade e morbidade por causas não-AIDS ¹⁰⁵. Sainz T et al encontraram, em grupo de crianças e adolescentes perinatalmente infectados pelo HIV e em TARV, que a razão LTCD4+/LTCD8+ estava inversamente associada, e de forma independente, com as frequências de células T expressando marcadores de ativação, senescência e exaustão, e com menores frequências das subpopulações naíve em LTCD4+ e LTCD8+ ¹⁰⁶. Os autores concluíam sugerindo que a inversão da razão LTCD4+/LTCD8+ poderia refletir um estado de ativação e senescência celular, apesar da TARV, de supressão viral, e de recuperação de LTCD4+ através da TARV,

corroborando com achados de estudos prévios em adultos ¹⁰⁶⁻¹⁰⁸. De forma semelhante, Alvarez et al demonstraram que a TARV não chegava a normalizar a razão LTCD4+/LTCD8+, considerando-a um indicador de progressão da doença ¹⁰⁹. Razões de LTCD4+/LTCD8+ na faixa de 1,5 e 2,5 são consideradas normais, porém reconhece-se que exista muita variabilidade segundo idade, etnia, sexo, entre outros fatores ¹¹⁰. No nosso estudo a razão LTCD4+/LTCD8+ média de todas as crianças incluídas foi de 1,6 (IC95% 1,3-1,8), portanto considerada normal, e em nenhum dos grupos estratificados pela idade de início de TARV a razão esteve invertida, possivelmente confirmando o sucesso terapêutico deste grupo, porém as crianças iniciando TARV antes dos 6 meses apresentavam razão LTCD4+/LTCD8+ mais alta se comparada às crianças iniciando TARV entre 1 e 5 anos e após os 5 anos de idade. Adicionalmente, a idade mais precoce de início de TARV esteve correlacionada com razões LTCD4+/LTCD8+ mais altas.

5.2 TARV precoce e preservação da maturação precoce, senescência e ativação de células T

As evidências disponíveis apontam para alterações do sistema imune no contexto de infecção pelo HIV, muitas vezes subclínicas, incluindo de ativação, maturação e envelhecimento precoce de células T, apesar de TARV e supressão viral ¹¹¹. Achados indicam alteração na diferenciação das células T, em particular de LTCD8+ ^{92,106,111-113}, com predomínio de subpopulações de memória efetora vs. naïve nos indivíduos infectados pelo HIV. Azzoni et al demonstraram, em um desdobramento do estudo CHER ⁷², que avaliou e comprovou os benefícios do início da TARV precoce em lactentes na África do Sul, que o início mais precoce de TARV preservava o compartimento naïve de LTCD8+, aproximando-os dos padrões vistos em lactentes não infectados pelo HIV (revisado em ¹⁴), e o compartimento de memória central de LTCD4+ ¹¹⁴. No nosso estudo, crianças iniciando TARV antes dos 6 meses de vida apresentavam menores frequências de LTCD4+ de memória efetora (TEM) do que aquelas iniciando TARV entre 1 e 5 anos, ou após os 5 anos de vida. Adicionalmente, crianças iniciando TARV antes dos 6 meses apresentaram frequência de LTCD8+ de memória efetora terminal (TTE) mais baixa do que crianças iniciando TARV após os 5 anos. Tais achados sugerem que o início de TARV mais precoce possa preservar subpopulações de LTCD4+ e LTCD8+ da diferenciação precoce.

Estudos prévios indicaram maior prevalência de fenótipo senescente e apoptótico em crianças infectadas pelo HIV, frequentemente tão precoce quanto no primeiro ano de vida^{49,113,115-118}. Entretanto, no estudo de Tandon R et al, em LTCD8+ de crianças e adolescentes infectados pelo HIV não houve diferenças nas frequências de marcadores clássicos de imunossenescência com o aumento da duração da infecção como esperado, e os autores questionam se haveriam outros marcadores que não os considerados clássicos para imunossenescência (CD57+ e CD57+CD28-) em crianças⁶⁵. Foldi et al encontraram que crianças infectadas pelo HIV, em particular crianças que não estivessem em TARV, apresentavam maiores frequências do marcador inibitório PD-1+ em LTCD4+ de memória (central e efetora), e digno de nota, esta expressão aumentada estava relacionada com maior progressão da doença avaliada através de parâmetros clínicos como carga viral, totais de LTCD4+ e razão LTCD4+/LTCD8+ entre outros¹¹⁹.

Outro achado importante desde estudo foi o fato de que uma vez iniciada a TARV, frequências de PD-1+ nos LTCD4+ de memória diminuía mas não se normalizavam, denotando prejuízo já estabelecido ao sistema imune. Apesar de ter sido realizado com adultos, o estudo de Cockerham LR et al é de nosso interesse por também ter investigado o efeito do momento de início de TARV (mais precoce vs. postergada) na expressão de PD-1: os autores estudaram a expressão de PD-1 em LTCD4+ e LTCD8+ em adultos durante infecção recente pelo HIV, iniciando TARV até 6 meses após o diagnóstico da infecção pelo HIV (grupo de TARV precoce) e iniciando TARV após 2 anos de diagnóstico (grupo de TARV postergada)¹²⁰. A expressão de PD-1 em todas as subpopulações de LTCD8+ e nas subpopulações de TLCD4+ de memória central e memória efetora eram mais altas do que nos controles durante a infecção recente pelo HIV, e níveis de PD-1 eram mais altos nas subpopulações de LTCD4+ e LTCD8+ do grupo que iniciou TARV mais tardiamente, porém após 1 ano de TARV, os níveis de PD-1 haviam decaído e eram similares nos 2 grupos¹²⁰. O estudo de Foldi et al¹¹⁹, assim como revisões anteriores, apontaram para o fato de que o envelhecimento precoce do sistema imune de crianças infectadas pelo HIV seria particularmente pronunciado na presença de replicação viral⁶⁷. Entretanto, Méndez-Lagares G et al, em seu estudo examinando marcadores

de senescência, ativação e proliferação celular nas várias subpopulações de LTCD4+ de crianças infectadas pelo HIV em TARV demonstrou aumento desses marcadores (CD28-CD57+ para senescência, HLA-DR+ para ativação e Ki67+ para proliferação) em pools de LTCD4+ total, de memória central, efetora e efetora terminal em comparação com controles saudáveis, e que não sofreram a influência de replicação viral ¹²¹. Nosso estudo procurou explorar alterações que persistissem a mais longo prazo, em situação de TARV e supressão viral sustentadas, e encontrou que frequentemente os grupos de crianças iniciando TARV mais precocemente apresentavam menores frequências de marcadores de senescência (CD57+), apoptose (CD95+), exaustão (PD-1+) e anergia (CD28-), em várias subpopulações de LTCD4+ e LTCD8+. De forma análoga, a menor idade de início de TARV nas crianças incluídas neste estudo esteve também frequentemente correlacionada com menores frequências de tais marcadores. Digno de nota, tais alterações e diferenças entre os grupos persistiram anos após a instituição da TARV, diferentemente do observado no estudo de Cockerham LR et al, e mesmo em situação de supressão viral.

Assim como nos adultos, nas crianças a ativação celular é característica da infecção crônica pelo HIV e está intimamente ligada à progressão da doença. Prendergast et al encontraram maiores frequências de LTCD8+ marcados com CD38+ e HLA-DR+ em crianças infectadas com HIV sem TARV no momento da inclusão no estudo, se comparadas a controles HIV negativos, marcadores estes sem relação com a carga viral dos pacientes, mas sim com o marcador de exaustão PD-1 em LTCD8+ ¹²². Paul ME et al encontraram que os progressores lentos, em comparação com as demais crianças infectadas pelo HIV, apresentavam nos primeiros 2 meses de vida porcentagens de LTCD4+ mais elevadas, níveis mais baixos de carga viral, valores mais baixos de LTCD8+, e menores porcentagens de LTCD8+ ativados (HLA-DR+), que por sua vez constituíam o melhor fator preditivo de progressão da doença aos 2 meses de idade: quanto mais baixa a sua frequência, menor a progressão da doença ³⁶.

A instituição da TARV é capaz de alterar os padrões de ativação celular e muitas vezes aproximá-los dos padrões dos indivíduos não infectados pelo HIV. Com o objetivo de examinar como a TARV alterava a homeostase das subpopulações linfocitárias e os padrões de ativação celular em crianças infectadas pelo HIV, um estudo comparou 41 crianças infectadas pelo HIV em São Paulo, em TARV com melhor ou pior resposta, medida através da carga viral, entre si e com um grupo controle de 20 crianças não infectadas. Níveis mais elevados de ativação celular de

LTCD8+, medida através da intensidade da expressão de CD38+, foram encontrados em crianças infectadas pelo HIV, especialmente no grupo de pior supressão viral ⁹². De forma semelhante, Alvarez et al demonstraram que o TARV em crianças infectadas pelo HIV perinatalmente melhorava rapidamente os padrões de ativação de LTCD4+ e LTCD8+ (CD38+HLA-DR+) ¹⁰⁹, e Azzoni et al demonstraram que lactentes que iniciaram a TARV mais precocemente (média de idade de início = 54 dias de vida) apresentavam menor frequência de LTCD8+ ativado (pela expressão de HLA-DR+ e CD95+) quando comparados a lactentes com início de TARV postergada (média de início: 220 dias de vida) ¹¹⁴. Tal estudo, de Azzoni L et al, porém, avaliou os benefícios descritos nas crianças ao completar 1 ano de idade, portanto no início da TARV, fosse precoce ou postergada. Nosso estudo entretanto teve a possibilidade de explorar os benefícios da TARV mais a longo prazo, já que as crianças tinham uma média de 9 anos de TARV na altura da inclusão, e encontrou que os marcadores clássicos de ativação (HLA-DR+, CCR5+ e CD38+) eram menos frequentes em diversas subpopulações de LTCD4+ e LTCD8+ nos grupos de crianças iniciando TARV mais precocemente, em especial antes dos 6 meses de idade.

Em pacientes infectados pelo HIV a função do timo em produzir LTCD4+ naïve é fundamental para a manutenção e recuperação da capacidade do sistema imune em continuar a responder a estímulos ¹²³. Tal produção é estimada a partir da pesquisa de LTCD4+ recém egressos do timo (marcados com CD31+) , que se reduzem durante a infecção pelo HIV mas são restaurados com o início da TARV ¹²⁴. Rakhour et al examinaram se as frequências dessas células em crianças infectadas pelo HIV de forma perinatal poderiam ser utilizadas para prever a progressão da doença pelo HIV. Seus resultados incluíram o achado de que uma frequência de LTCD4+ de células recém egressas do timo (CD31+) inferior a 50% era preditora de deterioração do sistema imune ¹²⁴. Em nosso estudo participantes apresentaram frequências de LTCD4+ total e naïve marcados com CD31+ ao redor de 50% e 73% respectivamente, sem diferença entre os grupos de crianças iniciando TARV em idades diferentes. Adicionalmente, consideramos que a frequência aumentada de marcadores de ativação e exaustão celular inclusive em LTCD4+ ou LTCD8+ recém egressos do timo (CD31+) supõe um comprometimento precoce de células T, visto de forma mais frequente nas crianças iniciando TARV mais tardiamente.

5.3 TARV precoce e resposta à vacinação

A vacinação de crianças infectadas pelo HIV é uma das estratégias mais importantes para a prevenção de outras doenças infecciosas, porém terá sua eficácia prejudicada se o sistema imune da criança não for capaz de desenvolver uma resposta adequada. Fatores que influenciam a capacidade de resposta à vacinação nestas crianças no que se refere aos compartimentos de células T e B se referem à reconstituição imune da criança pós início da TARV, tanto qualitativa e quanto quantitativamente, e são influenciados pela idade de início da TARV entre outros fatores: crianças que iniciam TARV mais precocemente tem uma melhor resposta à vacinação, contudo podem apresentar uma resposta imune comprometida (revisado em ⁸⁰). Nas crianças incluídas no nosso estudo, a TARV instituída mais precocemente pode ter desencadeado benefício na resposta às vacinas estudadas particularmente para a Caxumba (maiores títulos e maior percentual de protegidos) e a Rubéola (maiores títulos); porém tendências de maiores títulos e maiores proporções de protegidos relacionadas com idade de TARV mais precoce foram vistas para os demais antígenos, mesmo que sem significância estatística.

No nosso estudo encontramos uma imunidade variável conforme o antígeno após vacinação de rotina das crianças: a Caxumba teve a menor proporção de protegidos (44%) enquanto que 80% das crianças estavam protegidas contra a Hepatite A, um pouco abaixo de dados da literatura que descrevem boa resposta de crianças infectadas pelo HIV à vacinação contra a Hepatite A, variando de 85 a 100% (revisado por ¹²⁵. Crisinel PA et al também encontraram percentuais altos de proteção para a Hepatite A em crianças infectadas pelo HIV, porém estas apresentavam títulos mais baixos que crianças saudáveis, sugerindo uma menor duração da proteção ¹²⁵. Zaccarelli-Filho et al ao investigar resposta à vacinação de rotina para Difteria, Tétano, Sarampo, Rubéola e Hepatite B em crianças infectadas pelo HIV em TARV, porém com supressão viral variável, encontraram títulos relativamente baixos de resposta para Rubéola, variando de 27% nas crianças em falência de tratamento até 66% nas crianças com resposta à TARV parcial ⁹². Curiosamente, crianças em sucesso terapêutico apresentavam percentual de protegidos (43%) menor do que no grupo das crianças que respondiam parcialmente ao tratamento. No nosso estudo 57% das crianças em geral estavam protegidas para

a Rubéola, variando de 41% nas crianças iniciando TARV entre 1 e 5 anos, a 82% nas crianças iniciando TARV antes dos 6 meses. O estudo de Zaccarelli-Filho et al encontrou percentuais de proteção adequados para Hepatite B (variando nos grupos conforme a supressão viral entre 91% e 100%), sem diferença entre pacientes em supressão viral ou não ⁹², e próximos dos níveis esperados para crianças não infectadas pelo HIV: estima-se que uma série de 3 doses da vacina da Hepatite B induza proteção em mais de 95% das crianças saudáveis ¹²⁶. Abramczuk BM et al investigaram também resposta à vacinação contra Difteria, Tétano e Hepatite B, e de forma semelhante ao que encontraram Zaccarelli-Filho et al, no seu estudo crianças infectadas pelo HIV apresentavam boa resposta contra a Hepatite B, porém respostas menos adequadas à Difteria e Tétano ¹²⁷. No nosso estudo entretanto os níveis de proteção para a Hepatite B foram mais baixos do que os encontrados em ambos estudos: 64% nas crianças em geral, chegando a 55% no grupo das crianças iniciando TARV entre 1 e 5 anos. Siberry et al investigaram também a resposta de crianças vivendo com HIV à vacina MMR anos após o esquema vacinal e encontraram prevalências de soroproteção mais baixas do que nos controles: 57% para sarampo, 65% para rubéola e 59% para caxumba ⁹³. Digno de nota, entre outros fatores como índices mais altos de LTCD4+ e mais baixos de carga viral, o início de TARV mais precoce e o número de doses recebidas após o estabelecimento de TARV por no mínimo três meses foram importantes preditores de soroproteção ⁹³. Lima M et al estudaram a resposta contra a rubéola de crianças infectadas perinatalmente pelo HIV à vacina MMR dada aos 15 meses de idade, até 3 meses pós vacinação, e encontraram que a resposta variava conforme a classificação de gravidade da doença pelo HIV, passando de 62% nas crianças com comprometimento do sistema imune moderado a grave, até 100% nas crianças sem comprometimento na altura da vacinação ¹²⁸. No nosso estudo as proporções de proteção às doenças estudadas podem ser mais baixas que o esperado por conta do em geral longo intervalo entre a vacinação de rotina e a inclusão no estudo.

Nosso estudo teve como um de seus objetivos examinar a homeostase de LTCD4+ e LTCD8+, e a relação entre marcadores de ativação, senescência e exaustão celular e resposta vacinal. Milagres LG et al demonstraram em estudo explorando a resposta de crianças infectadas pelo HIV à vacina conjugada de meningococo C, que crianças que não responderam bem à vacinação apresentavam maior expressão de CD38+ e HLA-DR+ em LTCD4+, e menor frequência de linfócitos T reguladores (Treg), quando comparadas a crianças que apresentaram resposta

satisfatória à vacina ¹²⁹. De forma semelhante, del Pozo Balado Mdel M et al encontraram que a maior frequência de Treg em adultos infectados pelo HIV estava associada a menores títulos de proteção para a Hepatite B ¹³⁰. No nosso estudo as frequências de Treg não eram diferentes entre as crianças imunes ou não imunes para os quatro antígenos: Hepatite A, Hepatite B, Rubéola e Caxumba. Milagres LG et al exploraram em estudo subsequente a resposta à vacina conjugada de meningococo C em crianças infectadas pelo HIV e encontraram que crianças que responderam bem à vacinação apresentavam maiores frequências de LTCD4+ em estágios de menor diferenciação (naïve e TCM) em comparação às crianças que não responderam bem¹³¹. De forma semelhante, no nosso estudo a subpopulação de LTCD4+ naïve apareceu correlacionada de forma positiva com títulos para a Rubéola, e crianças imunes a apresentavam em maior frequência se comparadas às não imunes. Para as outras vacinas não houve diferença significativa entre imunes e não imunes no que tangia ao compartimento de LTCD4+ naïve. Também de maneira análoga, no nosso estudo a subpopulação de LTCD4+ de memória efetora (TEM) teve correlação negativa com títulos para a Rubéola, e menor frequência em imunes vs. não imunes. Diferente do encontrado por Milagres LG et al em relação à proteção contra o meningococo C ¹³¹, porém, no nosso estudo também a subpopulação de memória central (TCM) teve correlação negativa com títulos para a Rubéola, e menores frequências em imunes vs. não imunes. Esta diferença pode ser explicada porém pela diferença no intervalo da avaliação pós vacinação: no nosso estudo a avaliação dos marcadores de ativação e maturação se deu vários anos após a vacinação de rotina das crianças, enquanto que nos estudos de resposta à vacina contra o meningococo C aqui descritos, a avaliação da resposta se deu em um curto intervalo pós vacinação. Ao longo do tempo as subpopulações de LTCD4+ e LTCD8+ das crianças incluídas provavelmente sofreram as alterações esperadas por conta da infecção pelo HIV, tendência provavelmente amenizada por conta da TARV instituída nestas crianças, mas também por conta da idade, com perda progressiva dos compartimentos menos diferenciados em detrimento dos mais diferenciados (revisado em ⁹⁴).

Ainda sobre este estudo de Milagres LG et al ¹³¹, e diferentemente dos resultados do estudo anterior do mesmo grupo ¹²⁹, o grupo de respondedores à vacina apresentava frequências aumentadas de marcadores de ativação celular em algumas subpopulações de LTCD4+ e LTCD8+ ¹³¹. Os autores discutem que a ativação celular nas subpopulações linfocitárias deveria ser heterogênea, e sugerem que a ativação de populações menos diferenciadas, como observado no nosso estudo

em algumas situações, provavelmente teria um impacto maior por exemplo na resposta a vacinas ¹³¹. No nosso estudo portanto, e de forma semelhante, marcadores clássicos de ativação celular (HLA-DR, CCR5+, CD38+) tiveram uma relação ambivalente com a resposta vacinal, ora se relacionando com melhor, ora com pior resposta. Por exemplo a subpopulação de LTCD8+ de memória efetora (TEM) com marcadores de ativação (CD38+ CCR5+) apresentou correlação negativa com títulos para Hepatite A e menores frequências em imunes tanto para Hepatite A quando para Caxumba, enquanto que LTCD8+ totais, de memória central e efetora (TINT, TTM), com marcadores de ativação (CD38+, CCR5+, HLA-DR+), foram encontradas em maiores frequências em imunes para a Rubéola. A frequência dos marcadores de senescência (CD57+), anergia (CD28-), apoptose (CD95+) e exaustão (PD-1+) porém, em diversas subpopulações de LTCD4+ e LTCD8+, mais consistentemente se associaram a pior resposta às vacinas aqui estudadas.

Ainda em relação à resposta à vacina conjugada meningococo C, AC Frota et al examinaram a relação da carga viral com resposta vacinal, e encontraram que a manutenção da carga viral indetectável, independentemente dos níveis de LTCD4+ à entrada do estudo, estava associada à melhor resposta vacinal ¹³². No nosso estudo, como avaliamos a resposta à vacinação de rotina para doenças selecionadas, não sabemos as condições de carga viral e níveis de LTCD4+ na altura da vacinação, o que provavelmente alteraria a resposta às vacinas estudadas, mas examinando-se as médias de idade na última dose das vacinas de Hepatite A, Hepatite B e Tríplice/Tetra viral e a média de idade de início de TARV nos grupos, pode-se inferir que na maioria dos casos no mínimo a última dose das vacinas foi administrada em vigência de TARV. Provavelmente os progressores lentos desta coorte configuram exceção já que possivelmente iniciaram TARV em idade mais avançada daquela de aplicação da última dose das vacinas.

5.4 Células T reguladoras (Treg) e marcadores de ativação, maturação e exaustão celular

Células T reguladoras (Tregs) são extremamente importantes no funcionamento do sistema imune no que tange à manutenção da auto-tolerância e ao controle de doenças auto imunes, podendo inclusive estar associadas à não infecção HIV, i.e., à proteção de indivíduos expostos, através da manutenção de

menor ativação celular, por exemplo em profissionais do sexo estudadas no Quênia, e mesmo contribuindo para a não transmissão perinatal do HIV¹³³⁻¹³⁵. Tregs expressam níveis altos de CD25 (cadeia do receptor de IL-2) e do fator nuclear de transcrição P3 (FoxP3), e baixos níveis de CD127¹³⁶⁻¹³⁸. No nosso estudo as Treg foram marcadas como LTCD4+ CD25high CD127low FOXP3+, como descrito previamente na literatura¹³⁹. No contexto da infecção pelo HIV, os linfócitos Treg poderiam exercer papéis conflitantes tanto no sentido de conter a ativação celular associada à infecção pelo HIV quanto no sentido de diminuir a resposta imune contra o HIV, portanto de forma prejudicial ao sistema imune, dependendo do momento da infecção/ progressão da doença (revisado em¹⁴⁰). Porém de forma geral a expansão de linfócitos Treg parece estar associada a ativação celular em especial durante a infecção crônica na ausência de TARV e a contagens mais baixas de LTCD4+¹⁴⁰. Estudos apontam para o fato que pacientes que não apresentam recuperação adequada de LTCD4+ após início de TARV apresentam perfil de maior ativação celular, de imunossenescência, apoptose e exaustão, além de apresentarem um perfil de maturação de LTCD4+ alterado no sentido de apresentarem menos subpopulações naïve e acúmulo de células altamente diferenciadas, maiores frequências de linfócitos T regulatórios (Treg), e expressão alterada de biomarcadores solúveis; padrões alguns dos quais poderiam inclusive estar presentes mesmo antes do início da TARV¹⁴¹. A terapia antirretroviral porém em indivíduos com supressão viral bem sucedida parece diminuir e praticamente normalizar as frequências de linfócitos Treg, e nesses casos parece se relacionar inversamente com ativação celular residual¹⁴⁰. No nosso estudo a expansão de Treg associou-se a marcadores de maturação e senescência de linfócitos, apesar da TARV de sucesso, e de contagens de LTCD4+ mais altas. De forma semelhante, Khaitan et al defenderam a identificação de Tregs em crianças através da marcação concomitante de FoxP3 e Helios em estudo que demonstrou aumento da frequência de Tregs em crianças infectadas pelo HIV independentemente de TARV, e progressão maior da doença pelo HIV acompanhando a expansão de Treg¹⁴². Outro achado relevante de Khaitan et al., também de forma semelhante aos achados do nosso estudo, foi o fato de o aumento de Tregs estar associado a marcadores de ativação e exaustão em LTCD4+ de memória (CD38+, Ki67+ e PD-1+)¹⁴².

Prendergast et al encontraram menores frequências de células Treg em crianças infectadas pelo HIV sem TARV do que nos controles HIV negativos, e uma tendência de associação inversa entre frequência de Tregs e

ativação de LTCD8+ ¹²². De forma oposta, Cobos Jiménez V et al encontraram que pacientes infectados pelo HIV apresentavam uma maior percentagem de Tregs, comparados a controles HIV negativos ¹⁴³. Maiores frequências de Tregs se correlacionavam de forma positiva com percentuais de LTCD4+ ativados (CD4+CD38+HLA-DR+) mas não com percentuais de LTCD8+ ativados (CD8+CD38+HLA-DR+), diferentemente dos achados de Prendergast et al ¹²². Nos controles as frequências de Tregs se associaram negativamente com idade ¹⁴³. Freguja et al ,encontraram que as proporções de Treg de crianças infectadas pelo HIV tinham correlação positiva com níveis de LTCD8+ e LTCD8+ ativados (marcados com CD38+), e negativa com níveis de LTCD4+ ¹⁴⁴. Além disso, níveis de LTCD8+CD38+ e de Tregs aumentavam conforme aumentasse a viremia dos pacientes. No nosso estudo a frequência de Treg frequentemente se correlacionou de forma positiva com marcadores de apoptose (CD95+), exaustão (PD-1) e senescência (CD57+), em particular em LTCD4+ e LTCD8+ efetores, sugerindo que este estado de maturação precoce de células T acabaria por recrutar mais linfócitos Treg, na tentativa de diminuir este estado de inflamação/maturação.

5.5 Limitações

São várias as limitações deste estudo. Em primeiro lugar, tratou-se de um estudo transversal. Estudos longitudinais seriam mais eficientes na tentativa de estabelecer relações entre idade de início de TARV e os desfechos de interesse como ativação e maturação celular precoce, e resposta vacinal. O grupo de crianças estudado era composto de crianças de diferentes históricos clínicos no que tangia à evolução da doença e ao momento de início de TARV, tornando-o bastante heterogêneo. No sentido de mitigar os efeitos dessa heterogeneidade, como critérios de inclusão estabelecemos a carga viral indetectável, e a TARV instituída há no mínimo 6 meses. Finalmente, o tamanho amostral foi pequeno para análises estatísticas mais elaboradas e de maior poder, porém reflete a atual situação epidemiológica do HIV pediátrico no Brasil, em que há menos casos novos de crianças infectadas pelo HIV.

6. Conclusões

Os resultados deste estudo demonstraram que, em crianças infectadas perinatalmente pelo HIV, houve benefício da idade de início de TARV mais precoce na preservação do sistema imune, medido primeiramente através de contagem de LTCD4+ na inclusão no estudo assim como de LTCD4+ Nadir. O início da TARV precoce também preservou subpopulações de LTCD4+ e LTCD8+ de um perfil fenotípico de diferenciação precoce, do envelhecimento e exaustão celular. Estes achados têm implicação prática, como por exemplo no que tange à resposta imune a vacinas rotineiramente aplicadas na infância. Neste estudo o benefício da TARV mais precoce foi mais claro na avaliação da resposta imune à Caxumba e à Rubéola. Em conclusão, a preservação do sistema imune associada ao início mais precoce da TARV pode ser mensurada através de parâmetros imunes assim como de soroconversão vacinal.

7. Anexos



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Resposta imunológica e imunossenescência em crianças infectadas pelo HIV e idade de início de tratamento antirretroviral (TARV)

Pesquisador: Esper Georges Kallás

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 35523414.9.0000.0068

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.493.511

Apresentação do Projeto:

Projeto novo Resposta imunológica e imunossenescência em crianças infectadas pelo HIV e idade de início de tratamento antirretroviral (TARV)

Objetivo da Pesquisa:

Trata-se de um estudo transversal, exploratório, de marcadores da resposta imunológica, imunossenescência e ativação celular numa subpopulação do total de pacientes em cuidado (crianças e adolescentes <18 anos) recebendo TARV com sucesso, tendo iniciado TARV em diferentes idades e com diferentes graus de imunossupressão, a partir de 2009. O Estudo será realizado no Instituto de Infectologia Emílio Ribas. Com o intuito de detectar e explorar a função imunológica de pacientes menores de 18 anos que iniciaram a Terapia antirretroviral em diversas idades, para verificar através de estudos imunológicos se há benefícios em uma terapia antirretroviral precoce.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos se referem a punção venosa, somente o que está adequadamente explicado no TCLE. Os benefícios estão contemplados em relação a resposta imunológica definidos pelo pesquisador como: o Ativação celular: porcentagem de linfócitos T CD4+ ou CD8+ expressando concomitante marcadores para CD38 e HLA-DR. Imunossenescência: comprimento de telômeros, atividade da telomerase e porcentagem de linfócitos T CD4+ ou CD8+ expressando marcador para CD57.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappelq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 2.493.511

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Embora estudando uma população extremamente variável em relação a idade, e o Pesquisador não define o N de cada faixa etária. Embora refere que serão estudados 300 indivíduos. A pesquisa é importante no sentido de auxiliar a responder se a demora em iniciar a TARV pode causar imunossenescência do sistema imunológico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados.

Recomendações:

Aprovação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

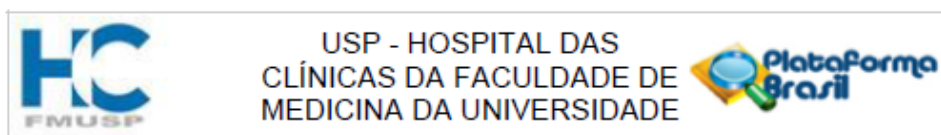
Não inadequações. Documentação adequada.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1066949_E3.pdf	24/01/2018 12:08:50		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Protocolo_v4_0_22Jan18.docx	24/01/2018 12:05:51	Esper Georges Kallás	Aceito
Outros	Form_Subm_EmendasEBrochuras_GruppoControleSadio_23Jan2018.pdf	24/01/2018 12:05:24	Esper Georges Kallás	Aceito
Outros	OficEncam_Protocolo_v4_0_22Jan2018.pdf	24/01/2018 12:04:45	Esper Georges Kallás	Aceito
Outros	OficEncam_Notif_ColabiCr_25Out16.pdf	25/10/2016 15:50:08	Esper Georges Kallás	Aceito
Outros	Carta_Anuencia_ICr_14Out2016.pdf	25/10/2016 15:49:14	Esper Georges Kallás	Aceito
Outros	FORMULARIO_PARA_SUBMISSAO_D E EMENDAS E BROCHURAS.doc	28/11/2014 15:28:49		Aceito
Outros	OficEncam_Emenda_IIErco-participante_28Nov2014.pdf	28/11/2014 15:27:03		Aceito
Outros	Emílio Ribas - Termo de Anuência Centro Coparticipante.pdf	10/11/2014 14:33:56		Aceito
Outros	Emílio Ribas - Termo de Anuência Centro Coparticipante.pdf	06/11/2014 15:19:57		Aceito
Outros	OficioEncam_Anuência_IIEmRibas_06Nov2014.pdf	06/11/2014 15:16:23		Aceito

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
 Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: capesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 2.493.511

Outros	CAPPesq_CadastroOnLineNº12897_assinado (13Ago2014).PDF	02/09/2014 12:05:37		Aceito
Outros	OficioEncam_Envio_CadastroOnLine_02Set2014.pdf	02/09/2014 12:04:44		Aceito
Folha de Rosto	Folha de Rosto.PDF	21/08/2014 15:41:48		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROPOSTA DE PESQUISA ER CAPPesq18Ago14.docx	19/08/2014 20:38:33		Aceito
Outros	termo de compromisso investigador E instituicao.jpg	17/08/2014 21:05:28		Aceito
Outros	SUBMISSAO AO CEP NOVOS ESTUDOS.jpg	17/08/2014 21:04:35		Aceito
Outros	LINK curriculum vitae PESQ.jpg	17/08/2014 21:04:20		Aceito
Outros	DECLARACAO DE RESP E COMPROMISSO DO PESQ 2.jpg	17/08/2014 21:04:05		Aceito
Outros	DECLARACAO DE RESP E COMPROMISSO DO PESQ 1.jpg	17/08/2014 21:03:45		Aceito
Outros	CONSENTIMENTO DO SUJEITO DE PESQ PARA ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS.jpg	17/08/2014 21:03:24		Aceito
Outros	COMPROMISSO COM DELINEAMENTO DO ESTUDO E MANUSEIO DE AMOSTRAS.jpg	17/08/2014 21:03:08		Aceito
Outros	centros participantes.jpg	17/08/2014 21:01:31		Aceito
Outros	BIORREPOSITORIO 2.jpg	17/08/2014 21:00:53		Aceito
Outros	BIORREPOSITORIO 1.jpg	17/08/2014 21:00:36		Aceito
Outros	UTILIZACAO FUTURA DE AMOSTRAS ARMAZENADAS 2.jpg	17/08/2014 21:00:18		Aceito
Outros	UTILIZACAO FUTURA DE AMOSTRAS ARMAZENADAS 1.jpg	17/08/2014 20:59:59		Aceito
Outros	Orcamento_Financeiro ER 08Ago2014.docx	17/08/2014 20:58:21		Aceito
Outros	Cronograma do Projeto ER.doc	17/08/2014 20:57:51		Aceito
Outros	questionario risco sexual ER 05Ago14.docx	15/08/2014 15:19:39		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo de Assentimento ER v1.0 05Ago14.doc	15/08/2014 15:15:49		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	Termo de Assentimento ER crianas v1.0 05Ago14.docx	15/08/2014 15:15:13		Aceito

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
 Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappelq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 2.493.511

Justificativa de Ausência	Termo de Assentimento ER crianças v1.0 05Ago14.docx	15/08/2014 15:15:13		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_ER v1.0 05Ago14.docx	15/08/2014 15:13:53		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 09 de Fevereiro de 2018

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
 Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappelq.adm@hc.fm.usp.br



INSTITUTO DE INFECTOLOGIA
EMÍLIO RIBAS - IIER



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Resposta imunológica e imunossenescência em crianças infectadas pelo HIV e idade de início de tratamento antirretroviral (TARV)

Pesquisador: Esper Georges Kallás

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 35523414.9.3001.0061

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.173.276

Data da Relatoria: 13/01/2015

Apresentação do Projeto:

De forma geral, como consequência da diminuição da incidência de novos casos de infecção pelo HIV em crianças e diminuição da mortalidade e aumento da sobrevivência de crianças recebendo TARV, serviços voltados para crianças vivendo com o HIV no mundo e no Brasil têm oferecido cuidados a pacientes infectados por via vertical pelo HIV chegando à adolescência e à vida adulta. Ao mesmo tempo, vem sendo despertado interesse para compreender melhor os efeitos do TARV instituído mais precocemente nas crianças na recuperação do sistema imune e na resposta às vacinas normais da infância, na formação de reservatórios latentes, na ativação e no envelhecimento celular.

Trata-se de um estudo transversal, exploratório, de marcadores da resposta imunológica, imunossenescência e ativação celular numa subpopulação do total de pacientes em cuidado (crianças e adolescentes <18 anos) recebendo TARV com sucesso, tendo iniciado TARV em diferentes idades e com diferentes graus de imunossupressão, a partir de 2009. Entre os pacientes sexualmente ativos, a prevalência de DSTs mais prevalentes no nosso contexto, assim como a relação com comportamento sexual (de risco ou não), e marcadores de ativação celular.

Hipótese:

A hipótese do objetivo principal deste estudo é de que a idade de início do TARV em crianças,

Endereço: Avenida Dr. Arnaldo 165

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3896-1406

Fax: (11)3896-1406

E-mail: comiteetca@emilioribas.sp.gov.br



INSTITUTO DE INFECTOLOGIA
EMÍLIO RIBAS - IIER



Continuação do Parecer: 1.173.276

quando se compara o início de TARV mais precoce vs. mais tardio, altera (ou modifica) padrões de resposta e envelhecimento imunológicos dos pacientes, ou padrões de ativação celular.

Critério de Inclusão:

Os pacientes a serem incluídos neste estudo exploratório deverão preencher os seguintes critérios de inclusão: • Idade inferior a 18 anos • Infecção confirmada pelo HIV (perinatal) • Em TARV há mais de seis meses, iniciado a partir de 2009 • Carga viral (CV) indetectável no último controle •

Paciente e familiar concordam com a participação no estudo segundo termos de assentimento da criança e consentimento do familiar

Critério de Exclusão:

Os pacientes a serem incluídos neste estudo exploratório não poderão deverão preencher nenhum dos seguintes critérios de exclusão: • Idade superior a 18 anos • Infecção confirmada pelo HIV de transmissão não perinatal • Não em TARV, ou em TARV há menos de seis meses, ou TARV

iniciado antes de 2009 • Carga viral (CV) detectável no último controle • Paciente e/ou familiar que não concorde com a participação no estudo •

Paciente com neoplasia (exceto carcinoma espinocelular ou basocelular) • Paciente em uso de medicação imunossupressora.

Desfecho Primário:

Os desfechos primários serão: o Ativação celular: porcentagem de linfócitos T CD4+ ou CD8+ expressando concomitante marcadores para CD38 e

HLA-DR. o Imunossenescência: comprimento de telômeros, atividade da telomerase e porcentagem de linfócitos T CD4+ ou CD8+ expressando marcador para CD57. o Resposta imune: o desenvolvimento de proteção imunológica frente à vacina da Hepatite B será medida nos pacientes vacinados; crianças ou adultos jovens apresentando níveis de anticorpos Anti-HBs superiores a 10,0 mUI/mL serão considerados imunizados, ou

seja, representarão casos de boa resposta imunitária.

Desfecho Secundário:

Os desfechos secundários serão: a. Marcadores sorológicos para: o Hepatite B o Herpes 2 o Sífilis o Gonorreia b. Valor do score de risco para DSTs; c. Estatura/Idade (Z score) e IMC/idade (Z score); d. Adequação do DNPM para idade; e. Classificação de Tanner; f. Proporção de pacientes com polimorfismo CCR532.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Este estudo visa explorar, em crianças e adolescentes infectados pelo HIV por via vertical, em

Endereço: Avenida Dr. Arnaldo 165
 Bairro: Cerqueira César CEP: 01.246-900
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)3896-1406 Fax: (11)3896-1406 E-mail: comiteetica@emilioribas.sp.gov.br



INSTITUTO DE INFECTOLOGIA
EMÍLIO RIBAS - IIER



Continuação do Parecer: 1.173.276

tratamento antirretroviral e com boa resposta

viroológica, o impacto da idade de início do tratamento antirretroviral nos padrões de resposta imunológica, imunossenescência precoce e ativação celular.

Definições: Tratamento antirretroviral com boa resposta virológica será definido como pacientes em tratamento há pelo menos seis meses e apresentando carga viral indetectável.

Objetivo Secundário:

Determinar, na mesma coorte de crianças e adolescentes infectados pelo HIV por via vertical: a. A prevalência de determinadas DSTs nos adolescentes sexualmente ativos, assim como quais variáveis consideradas como possíveis fatores de risco estão associados a elas;b. Avaliar a distribuição de um score de risco para DSTs nessa população e sua associação com presença ou não de diferentes DSTs;c. Avaliar associação dos padrões encontrados de ativação celular com presença ou não de diferentes DSTs;d. O impacto da idade de início do tratamento antirretroviral em parâmetros de crescimento;e. O impacto da idade de início do tratamento antirretroviral no desenvolvimento neuropsicomotor;f. O impacto da idade de início do tratamento antirretroviral na maturação sexual;g. A proporção de pacientes com polimorfismo em CCR5 (presença da deleção CCR532).h. A associação dos parâmetros de progressão da doença e polimorfismo em CCR5.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos relacionados a coleta de exames e confidencialidade.

Não há benefícios diretos ao participante.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante para o conhecimento da resposta imunológica e da imunossenescência de crianças vivendo com o HIV.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos adequados, TCLE claro.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Estudo aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Avenida Dr. Arnaldo 165
 Bairro: Cerqueira César CEP: 01.246-900
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)3896-1406 Fax: (11)3896-1406 E-mail: comiteetica@emilioribas.sp.gov.br



INSTITUTO DE INFECTOLOGIA
EMÍLIO RIBAS - IIER



Continuação do Parecer: 1.173.276

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O pesquisador deverá entregar uma cópia do Parecer de Aprovação do CEP à Seção de Pesquisa e Trabalhos Científicos da Divisão Científica e aguardar o documento denominado "Autorização Para o Início do Estudo".

O pesquisador principal fica informado de apresentar a este CEP os relatórios parciais e o final do estudo, conforme prevê a Resolução CNS nº 466/2012.

SAO PAULO, 06 de Agosto de 2015

Assinado por:

TÂMARA NEWMAN LOBATO SOUZA
(Coordenador)

Endereço: Avenida Dr. Arnaldo 165

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3896-1406

Fax: (11)3896-1406

E-mail: comiteetica@emilioribas.sp.gov.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I- DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

NOME DO VOLUNTÁRIO:.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº:..... SEXO: M

F

DATA NASCIMENTO:.....

.

ENDEREÇO:.....
.....

BAIRRO:.....

CIDADE:.....

CEP:..... TELEFONE (DDD):
(.....).....

RESPONSÁVEL LEGAL:.....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador, etc):.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº:..... SEXO: M

F

DATA NASCIMENTO:.....

.

ENDEREÇO:.....
.....

BAIRRO:.....

CIDADE:.....

CEP:..... TELEFONE (DDD):
(.....).....

II- DADOS SOBRE A PESQUISA

TÍTULO: “RESPOSTA IMUNOLOGICA E IMUNOSSENECENCIA EM CRIANCAS INFECTADAS PELO HIV E IDADE DE INICIO DE TRATAMENTO ANTIRETROVIRAL (TARV)”

PESQUISADOR: Prof. Dr. Esper G. Kallás

CARGO/FUNÇÃO: Médico – Pesquisador INSC. CONSELHO REGIONAL Nº: CRM 67395

PESQUISADOR EXECUTANTE: Dra. Beatriz Thome

CARGO/FUNÇÃO: Médico – Pesquisador INSC. CONSELHO REGIONAL Nº: CRM 103951

UNIDADE DO INSTITUTO DE INFECTOLOGIA EMILIO RIBAS: Ambulatório de Pediatria

UNIDADE DO HCFMUSP: LIM 60 – Disciplina de Imunopatologia e Alergia – Departamento de Clínica Médica

AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO RISCO BAIXO RISCO MÉDIO RISCO MAIOR

DURAÇÃO DA PESQUISA: 3 anos

ESCLARECIMENTOS SOBRE A PESQUISA:

1) Desenho do estudo e objetivo: Você/seu filho está sendo convidado a participar deste estudo, cujo objetivo é o de conhecer melhor o efeito da idade de início do tratamento antirretroviral (TARV) no funcionamento das células de defesa do organismo humano (sistema imunológico), assim como no crescimento e no desenvolvimento das crianças. Para isso, esse estudo pretende observar em laboratório, de que forma as células de defesa do organismo se comportam quando o indivíduo está em tratamento antirretroviral. Outros objetivos deste estudo são o de conhecer melhor o comportamento sexual daqueles pacientes com vida sexual ativa, determinar a proporção de pacientes com outras doenças sexualmente transmissíveis (DSTs), e os principais fatores que aumentam o risco para contraí-las. Serão estudadas, principalmente, as células de defesa chamadas Células T e algumas partes destas células T (partes que também ajudam na defesa do organismo), chamadas HLA. A parte clínica deste estudo servirá para coletar amostras e informações sobre o histórico vacinal, o tratamento e a saúde dos pacientes, e o comportamento sexual quando adequado. Participarão deste estudo um grupo de pessoas voluntárias, formado por crianças e adolescentes (de 0 a 18 anos incompletos) em tratamento antirretroviral há mais de seis meses e carga viral (CV) indetectável.

2) Procedimentos: Após a assinatura deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido em duas vias (uma será entregue a você e a outra ficará nos arquivos do estudo), os procedimentos da pesquisa incluirão: coleta de sangue para exames laboratoriais (para hemograma, biquímica, análise das células de defesa), entrevista com o médico do estudo, e coleta de informações médicas. Amostras de sangue de 50 mL para adolescentes e crianças maiores (que corresponde aproximadamente a 3½ colher de sopa) e 2-5 mL (que corresponde a 1 colher de chá) para bebês e crianças menores, segundo o peso, serão coletadas no dia da inclusão. A retirada do sangue será feita por uma agulha esterilizada descartável, que será introduzida na veia do braço (procedimento rotineiro). Eventualmente você/seu filho será convidado para responder a um questionário individualmente (auto administrado) que tratará do seu comportamento sexual/do seu filho. Se você/seu filho aceitar responder o questionário, você/seu filho não responderá às perguntas que o deixarem desconfortável. Informações sobre a sua saúde/de seu filho e o seu tratamento/de seu filho serão coletadas de seus registros médicos.

3) Desconfortos e riscos esperados: Os riscos relacionados à participação são mínimos. Algumas pessoas referem dor no local da punção venosa e sensação de desmaio e raramente ocorrem complicações como formação de hematomas ou infecções locais. Algumas pessoas podem se sentir desconfortáveis ao discutir questões relacionadas à sua vida sexual.

4) Benefícios para o participante: Este é um estudo experimental, que avaliará a relação entre início do TARV e o sistema imunológico, assim como possíveis fatores de risco para DSTs, portanto, não há benefício direto para você/seu filho durante o desenvolvimento do estudo.

5) Direitos e garantias:

- **Garantia de acesso:** Em qualquer etapa do estudo, você/seu filho tem total liberdade de questionar os profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de dúvidas sobre o estudo. O principal investigador é o Dr. Esper G. Kallás, que pode ser encontrado no endereço: Av. Dr. Arnaldo, 455 – 3º andar – sala **3205**, telefone(s) **3061-8314** ou **3061-8395**. O pesquisador executante é a Dr. Beatriz Thome, que pode ser encontrada no telefone **38855313**. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq) - Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: **2661-6442** ramais 16, 17 ou 20, FAX: 2661-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br. Poderá entrar em contato também com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto de Infectologia Emílio Ribas no telefone: (11) 3896-1406, ou Email: comiteetica@emilioribas.sp.gov.br.

- **Garantia de liberdade:** Você/seu filho tem a liberdade de retirar o consentimento/assentimento e deixar de participar do estudo a qualquer momento, sem que isto acarrete qualquer prejuízo no seu atendimento clínico, laboratorial, ou continuidade de seu tratamento na Instituição/de seu filho. Neste caso, todo sangue coletado será descartado.

- **Direito de confidencialidade:** Todo o possível será feito para assegurar que as informações pessoais registradas no prontuário médico sejam mantidas em privacidade; respostas às perguntas, registros e amostras coletadas para exames laboratoriais vão ser manejados com o máximo de privacidade. O seu nome/de seu filho não vai aparecer nos questionários respondidos nem nas amostras de sangue. Informações pessoais serão fornecidas se requerido por lei. Se as informações deste estudo forem publicadas ou apresentadas em encontros científicos, o seu nome/de seu filho ou outras informações pessoais não serão usados. O seu nome/de seu filho não aparecerá em nenhum relatório publicado sobre os resultados desta pesquisa.

- **Direito de atualização:** O voluntário tem o direito garantido de saber sobre os resultados parcial ou total de conhecimento dos pesquisadores.

- **Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa:** É garantido que os dados obtidos neste estudo, bem como todo o material armazenado, só serão utilizados em outras pesquisas com a permissão do voluntário.

- **Direito à Assistência e Indenização:** Caso você/seu filho venha a sofrer qualquer tipo de dano previsto ou não no termo de consentimento e resultante de sua participação no protocolo, você/seu

filho terá direito à assistência integral e direito à indenização assumidos pelo pesquisador, pela instituição e pelo patrocinador da pesquisa.

- Suspensão do Estudo Imediata: A pesquisa será suspensa imediatamente caso o pesquisador responsável perceba algum risco ou dano à saúde, inclusive psicológica, do voluntário, conseqüente à mesma, não previsto no termo de consentimento.

6) Despesas e ressarcimento : A participação neste estudo é voluntária e não haverá despesas pessoais em qualquer fase, incluindo exames e consultas. Também não haverá compensação financeira pela sua participação/de seu filho.

CONSENTIMENTO PARA O ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS DE SANGUE NÃO UTILIZADAS

Durante o estudo faremos exames laboratoriais, e se os exames puderem ser feitos satisfatoriamente sem necessidade de repetição sobrar uma quantidade do sangue colhido. Você decide se podemos manter armazenadas as amostras não utilizadas após o final da pesquisa. Se você aceitar, nenhuma amostra extra de sangue terá que ser colhida. O sangue será armazenado, por 5 anos, período que poderá ser prorrogado por mais 5 anos com autorização do Comitê de Ética em Pesquisa. As amostras armazenadas ficarão sob a responsabilidade do Dr. Esper Georges Kallás, no Laboratório de Investigação Médica da Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia (LIM 60).

Nós poderemos usar as amostras armazenadas para saber mais sobre os efeitos da infecção pelo vírus do HIV e do tratamento antirretroviral no sistema imunológico. Os avanços médicos baseados em pesquisas futuras poderão beneficiar a você/seu filho ou a outras pessoas no futuro. Seu sangue não será vendido nem usado para a produção comercial de produtos derivados. Nenhum tipo de pesquisa será feita com as amostras armazenadas de seu sangue sem que haja revisão e autorização por um Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).

A decisão de nos autorizar a armazenar o sangue não utilizado para pesquisas futuras é voluntária. Se você decidir não armazenar nós destruiremos suas amostras ao final do estudo. A qualquer momento você poderá entrar em contato com os pesquisadores e pedir que seu sangue/de seu filho não seja usado para pesquisas; neste caso, todas as suas amostras identificáveis que forem encontradas em nossos laboratórios serão destruídas.

Para fazer isso necessitamos de sua autorização; portanto, por favor, leia a afirmação a seguir cuidadosamente e marque SIM ou NÃO, de acordo com a opção que melhor expressa a sua opinião. Independente do que você decidir, sua decisão não afetará seus cuidados de saúde nem sua participação neste estudo/de seu filho.

Se sua resposta for NÃO, isto não influenciará a sua participação no estudo/de seu filho.

“Minhas amostras de sangue podem ser armazenadas para uso futuro em pesquisas para saber mais sobre o tratamento da infecção pelo vírus do HIV”

 SIM NÃO

OBS: O tempo de armazenamento do material será autorizado pela Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq)

Há necessidade de consultá-lo para autorizar o uso deste material doado em outras pesquisas científicas?

() SIM. Eu quero ser consultado para autorizar ou não cada pesquisa futura com o meu material/de meu filho.

() NÃO. Eu dispenso a autorização para cada pesquisa e estou informado(a) que a Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq) irá examinar a nova pesquisa e decidir sobre a utilização.

CONSENTIMENTO PARA A UTILIZAÇÃO DO DNA PARA FINS RELACIONADOS AO ESTUDO

Amostras de DNA (DNA é o seu material genético) serão retidas para usar no estudo genético (genotipagem) do antígeno leucocitário humano (HLA) para auxiliar na investigação das respostas de células T em pacientes em tratamento antirretroviral.

HLA são partes (moléculas) das células de defesa presentes em todos os seres humanos, que caracterizam cada indivíduo e que está associada à forma de evolução da doença relacionada ao HIV. Também é utilizada na avaliação de compatibilidade de transplantes entre doadores e receptores de órgãos. Essas informações genéticas serão mantidas em segredo pela equipe do estudo. As informações serão armazenadas com identificadores codificados e não com o nome do participante.

Para que se possa analisar o seu HLA/ de seu filho, precisamos que você autorize a sua utilização. Por favor, leia o parágrafo a seguir e marque SIM ou NÃO na opção que melhor expressar a sua decisão:

Se sua resposta for NÃO, isto não influenciará a sua participação no estudo.

“Eu permito o uso de DNA para fins relacionados ao estudo.”

SIM

NÃO

CONSENTIMENTO

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou foram lidas para mim, descrevendo o estudo “RESPOSTA IMUNOLOGICA E IMUNOSSENECENCIA EM CRIANCAS INFECTADAS PELO HIV E IDADE DE INICIO DE TRATAMENTO ANTIRETROVIRAL (TARV)”. Eu discuti com o Dr. Esper G. Kallás ou um membro de sua equipe, sobre a minha decisão em participar deste estudo/ autorizar que meu filho participe. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação/ de meu filho é isenta de despesas, e que a decisão de participação não altera meu tratamento no hospital/de meu filho. Concordo voluntariamente em participar deste estudo/ que meu filho participe e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízos ou perdas de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço/de meu filho.

Assinatura do Paciente/Representante Legal

Data: _____

Assinatura da Testemunha

Data: _____

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Data: _____

Assinatura da pessoa que obteve o consentimento

Assinatura do Responsável pelo estudo

Termo de Assentimento Livre e Esclarecido - HCFMUSP
Versão 1.0 de 05 de Agosto de 2014

"RESPOSTA IMUNOLÓGICA E IMUNOSSENECÊNCIA EM CRIANÇAS INFECTADAS PELO HIV E IDADE DE INÍCIO DE TRATAMENTO ANTIRETROVIRAL (TARV)"

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – HCFMUSP
TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(para menores de 18 anos)

1 – Título do protocolo de pesquisa - "RESPOSTA IMUNOLÓGICA E IMUNOSSENECÊNCIA EM CRIANÇAS INFECTADAS PELO HIV E IDADE DE INÍCIO DE TRATAMENTO ANTIRETROVIRAL (TARV)"

2 – Convite

Você está sendo convidado(a) a participar da pesquisa que se chama "RESPOSTA IMUNOLÓGICA E IMUNOSSENECÊNCIA EM CRIANÇAS INFECTADAS PELO HIV E IDADE DE INÍCIO DE TRATAMENTO ANTIRETROVIRAL (TARV)". Antes de decidir se quer participar, é importante que você entenda esta pesquisa e como você pode participar dela. Conversamos com seus pais ou responsáveis e eles sabem que também estamos pedindo sua autorização. Você pode perguntar qualquer coisa aos seus pais, amigos ou qualquer um com quem você se sentir a vontade para conversar, pois pode haver algumas palavras que não entenda ou coisas que você quer que sejam mais explicadas porque você ficou mais interessado ou preocupado. Caso isso aconteça, por favor, pode interromper e pedir a explicação a qualquer momento. Não tenha pressa de decidir se deseja ou não participar desta pesquisa. Se você não desejar fazer parte da pesquisa, não é obrigado, até mesmo se seus pais concordarem.

Obrigado (a) por ler este material.

3 – O que é a pesquisa e porque estamos fazendo isto?

Nós estamos estudando o tratamento da infecção pelo vírus do HIV, também conhecido como tratamento antiretroviral (TARV). Ele é responsável por diminuir e até acabar com a multiplicação do vírus no corpo dos pacientes. O tratamento com antiretrovirais (TARV) também é capaz de recuperar a função do sistema de defesas do corpo mas não se sabe bem como a idade de início do tratamento interfere nessa recuperação, assim como em outros aspectos da função do sistema de defesas humano. Então, nós queremos estudar melhor essa relação para entender qual o melhor momento de iniciar o TARV nas crianças, estudando pacientes que estão saudáveis em uso da medicação (TARV). Nós também estamos estudando a presença de outras doenças transmitidas pelo sexo, no caso de pessoas que já tem relações sexuais. Se esse for o seu caso, nós faremos algumas perguntas relacionadas aos seus hábitos em relação ao sexo, se você concordar e se sentir à vontade. Nosso interesse é entender quais fatores colocam os adolescentes em risco de adquirir essas doenças para poder criar melhores estratégias de prevenção.

4 – Por que você está sendo convidado(a)?

Você está sendo convidado(a) para participar desta pesquisa porque o seu tratamento (TARV) está funcionando muito bem e nós queremos estudar como está funcionando o seu sistema de defesas. Outras crianças e adolescentes da sua idade também serão convidados a participar desta pesquisa.

5 – Você tem que participar?

Você é quem decide se quer participar ou não desta pesquisa. Se decidir participar, você precisará assinar esta folha de informações e levar para casa para deixar guardado. Você não é obrigado a participar nesta pesquisa. Ninguém ficará bravo ou desapontado com você se você disser não: a escolha é sua. Se você quiser, você pode pensar nisso e falar depois. Você pode dizer "sim" agora e mudar de ideia depois, e tudo continuará bem. Você continuará a ser cuidado aqui no hospital.

Rúbrica do Responsável Legal _____ Rúbrica do Médico _____

Termo de Assentimento Livre e Esclarecido - HCFMUSP
Versão 1.0 de 05 de Agosto de 2014

"RESPOSTA IMUNOLÓGICA E IMUNOSSENECENCIA EM CRIANÇAS INFECTADAS PELO HIV E IDADE DE INÍCIO DE TRATAMENTO ANTIRETROVIRAL (TARV)"

6 – Como você vai participar?

Depois que você assinar esta folha de informações (Termo de Assentimento Livre e Esclarecido) em duas cópias (uma deverá ser entregue a você e a outra ficará com o médico da pesquisa), vamos fazer algumas atividades juntos. Vamos coletar um pouco de sangue da veia do seu braço para alguns exames. Estes exames vão mostrar como estão as células de defesa do seu corpo. Alguns pacientes também poderão ser convidados a responder a um questionário de hábitos sexuais individualmente. Se este for o seu caso você pode escolher responder ou não ao questionário, e não responder a todas as perguntas do questionário se assim decidir.

7 – O que pode ter de bom e ruim se você participar da pesquisa?

Participando desta pesquisa, você estará ajudando a conhecer melhor os efeitos do tratamento antirretroviral. Em alguns casos poderá também estar ajudando a conhecer melhor o comportamento dos adolescentes e seus riscos para sua saúde.

Algumas pessoas podem sentir dor no local da picada da agulha no braço, e pode aparecer uma mancha roxa e/ou dolorida no local que agulha entrou, mas que em alguns dias desaparece. Algumas pessoas não gostam de responder perguntas sobre a sua intimidade e vida sexual.

8 – O que vai acontecer quando a pesquisa terminar?

Esta pesquisa vai durar 3 anos. Quando a pesquisa terminar, nós poderemos guardar o seu sangue na geladeira do hospital, para usarmos em alguma outra pesquisa sobre o HIV. Mas nós só guardaremos seu sangue se você concordar. Se você não concordar, nós jogaremos tudo fora. Nós faremos o que você decidir.

Depois que a pesquisa acabar vamos contar o que aprendemos para você e para seus pais. Depois, contaremos em reuniões para outras pessoas interessadas no trabalho que fazemos, como cientistas e médicos, e vamos escrever também sobre esta pesquisa.

9 – A sua participação nesta pesquisa será mantida em segredo?

Não contaremos para outras pessoas que você está nesta pesquisa. Só o pessoal da equipe da pesquisa vai saber, este é o nosso segredo! Nem o seu nome vai aparecer, porque você vai ganhar um número que será só seu até o fim da pesquisa.

10 – Quem deixou esta pesquisa acontecer?

Existe um grupo de pessoas no hospital - Comitê de Ética em Pesquisa - que lê, estuda e deixa as pesquisas que estão boas acontecerem. Eles cuidam da proteção das pessoas que participam das pesquisas para que tudo seja feito direitinho. Aqui está o endereço desse grupo de pessoas no nosso hospital. Você pode ligar para lá se precisar.

Nome: Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto de Infectologia Emílio Ribas no telefone: (11) 3896-1406, ou Email: comiteetica@emilioribas.sp.gov.br

Você também pode ligar para:

Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) — tel: 2661-6442 ramais 16, 17, ou 20,
Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar, São Paulo, SP
Telefone: 2661-6442 ramais 16, 17, ou 20, FAX: 2661-6442 ramal 26

Rúbrica do Responsável Legal _____ Rúbrica do Médico _____

REGIÃO JUCAR

Termo de Assentimento Livre e Esclarecido - HCFMUSP

Versão 1.0 de 05 de Agosto de 2014

"RESPOSTA IMUNOLÓGICA E IMUNOSSENECENCIA EM CRIANÇAS INFECTADAS PELO HIV E IDADE DE INÍCIO DE TRATAMENTO ANTIRETROVIRAL (TARV)"

E-mail: cappesq@hc.fm.usp.br.

Horário de Funcionamento: 2ª a 6ª feira de 8 às 16h

11 – Com quem mais posso falar?

Se você precisar de qualquer outra informação, ligue para o médico da pesquisa, o Dr. Esper G. Kallás, que pode ser encontrado no endereço: Av. Dr. Arnaldo, 455 – 3º andar – sala 3205, telefone(s) 3061-8314 ou 3061-8395. Você também pode falar com a Dra. Beatriz Thome, pelos telefones 38855313 ou 983774937.

14 – Vou ganhar dinheiro para participar na pesquisa?

Você não vai ganhar nenhum dinheiro para participar na pesquisa.

Obrigado por ler estas informações. Se quiser participar desta pesquisa, assine esta folha de informações – Termo de Assentimento Livre e Esclarecido - e devolva-o ao Médico da Pesquisa. Você deve guardar uma cópia destas informações com você.

ASSENTIMENTO

Eu entendi que a pesquisa é sobre o tratamento antirretroviral e seus efeitos no sistema de defesas. Eu entendi que eu darei uma amostra de sangue através de uma picada no braço no momento que entrar no estudo e minhas informações serão coletadas do meu arquivo médico do hospital.

SIM, eu quero participar na pesquisa

NÃO, eu não quero participar na pesquisa

Assinatura do Paciente

Data: _____

Rúbrica do Responsável Legal _____

Rúbrica do Médico _____

8. Referências

1. Global HIV & AIDS statistics — 2018 fact sheet [Internet]. [cited 2019 Feb 25]. Available from: <http://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>
2. UNICEF. Children, HIV and AIDS - Global Snapshot [Internet]. 2018. Available from: <https://data.unicef.org/wp-content/uploads/2018/11/Global-snapshot-2018.pdf>
3. UNAIDS. Miles to go. Global AIDS Update. [Internet]. 2018. Available from: http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/miles-to-go_en.pdf
4. Ministério da Saude do Brasil. Boletim Epidemiológico - HIV Aids. 2018.
5. WHO. Guideline on when to start antiretroviral therapy and on pre-exposure prophylaxis for HIV. 2015.
6. WHO. Consolidated ARV guidelines. 2013.
7. WHO | Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection [Internet]. WHO. 2016 [cited 2016 Nov 7]. Available from: <http://www.who.int/hiv/pub/arv/arv-2016/en/>
8. Ministério da Saúde do Brasil. Recomendações para terapia antirretroviral em crianças e adolescentes infectados pelo HIV. 2009.
9. CDC. Revised classification system for human immunodeficiency virus infection in children less than 13 years of age. MMWR Recomm Rep. 1994;43(RR-12).
10. Ministério da Saude do Brasil. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Crianças e Adolescentes. 2014.
11. Ministério da Saúde do Brasil. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos. 2013.
12. Ministério da Saude do Brasil. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Crianças e Adolescentes [Internet]. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das IST, do HIV/Aids das Hepatites Virais. 2017 [cited 2018 Mar 22]. Available from: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2017/protocolo-clinico-e-diretrizes-terapeuticas-para-manejo-da-infeccao-pelo-hiv-em-criancas-e>
13. UNAIDS, AIDSinfo. Country factsheets - BRAZIL. 2018.

14. Tobin NH, Aldrovandi GM. Are infants unique in their ability to be “functionally cured” of HIV-1? *Curr HIV/AIDS Rep.* 2014 Mar;11(1):1–10.
15. Muenchhoff M, Prendergast AJ, Goulder PJR. Immunity to HIV in Early Life. *Front Immunol.* 2014;5:391.
16. Ono E, Nunes dos Santos AM, de Menezes Succi RC, Machado DM, de Angelis DSA, Salomão R, et al. Imbalance of naive and memory T lymphocytes with sustained high cellular activation during the first year of life from uninfected children born to HIV-1-infected mothers on HAART. *Braz J Med Biol Res Rev Bras Pesqui Médicas E Biológicas Soc Bras Biofísica Al.* 2008 Aug;41(8):700–8.
17. Simonetta F, Bourgeois C. CD4+FOXP3+ Regulatory T-Cell Subsets in Human Immunodeficiency Virus Infection. *Front Immunol.* 2013;4:215.
18. Mofenson LM, Korelitz J, Meyer WA, Bethel J, Rich K, Pahwa S, et al. The relationship between serum human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA level, CD4 lymphocyte percent, and long-term mortality risk in HIV-1-infected children. National Institute of Child Health and Human Development Intravenous Immunoglobulin Clinical Trial Study Group. *J Infect Dis.* 1997 May;175(5):1029–38.
19. Thobakgale CF, Ramduth D, Reddy S, Mkhwanazi N, de Pierres C, Moodley E, et al. Human immunodeficiency virus-specific CD8+ T-cell activity is detectable from birth in the majority of in utero-infected infants. *J Virol.* 2007 Dec;81(23):12775–84.
20. Shalekoff S, Meddows-Taylor S, Gray GE, Sherman GG, Coovadia AH, Kuhn L, et al. Identification of human immunodeficiency virus-1 specific CD8+ and CD4+ T cell responses in perinatally-infected infants and their mothers. *AIDS Lond Engl.* 2009 Apr 27;23(7):789–98.
21. Luzuriaga K, Chen YH, Ziemniak C, Siberry G, Strain MC, Richman DD, Chun TW, Cunningham CK, Persaud D. Absent HIV-specific immune responses and replication-competent HIV reservoirs in perinatally-infected youth treated from infancy: towards cure; Abstract 171LB presented at: 20th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections in Atlanta; GA, USA. 2013 Mar 3;
22. Rainwater-Lovett K, Luzuriaga K, Persaud D. Very early combination antiretroviral therapy in infants: prospects for cure. *Curr Opin HIV AIDS.* 2015 Jan;10(1):4–11.

23. Pierson T, McArthur J, Siliciano RF. Reservoirs for HIV-1: mechanisms for viral persistence in the presence of antiviral immune responses and antiretroviral therapy. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:665–708.
24. Ananworanich J, Schuetz A, Vandergeeten C, Sereti I, de Souza M, Rerknimitr R, et al. Impact of multi-targeted antiretroviral treatment on gut T cell depletion and HIV reservoir seeding during acute HIV infection. *PloS One.* 2012;7(3):e33948.
25. Persaud D, Pierson T, Ruff C, Finzi D, Chadwick KR, Margolick JB, et al. A stable latent reservoir for HIV-1 in resting CD4(+) T lymphocytes in infected children. *J Clin Invest.* 2000 Apr;105(7):995–1003.
26. Luzuriaga K, Tabak B, Garber M, Chen YH, Ziemniak C, McManus MM, et al. HIV Type 1 (HIV-1) Proviral Reservoirs Decay Continuously Under Sustained Virologic Control in HIV-1–Infected Children Who Received Early Treatment. *J Infect Dis.* 2014 Nov 15;210(10):1529–38.
27. Ananworanich J, Puthanakit T, Suntarattiwong P, Chokephaibulkit K, Kerr SJ, Fromentin R, et al. Reduced markers of HIV persistence and restricted HIV-specific immune responses after early antiretroviral therapy in children. *AIDS Lond Engl.* 2014 Apr 24;28(7):1015–20.
28. Rainwater-Lovett K, Ziemniak C, Watson D, Luzuriaga K, Siberry G, Petru A, et al. Paucity of Intact Non-Induced Provirus with Early, Long-Term Antiretroviral Therapy of Perinatal HIV Infection. *PloS One.* 2017;12(2):e0170548.
29. Persaud D, Palumbo PE, Ziemniak C, Hughes MD, Alvero CG, Luzuriaga K, et al. Dynamics of the resting CD4(+) T-cell latent HIV reservoir in infants initiating HAART less than 6 months of age. *AIDS Lond Engl.* 2012 Jul 31;26(12):1483–90.
30. Blanche S, Tardieu M, Duliege A, Rouzioux C, Le Deist F, Fukunaga K, et al. Longitudinal study of 94 symptomatic infants with perinatally acquired human immunodeficiency virus infection. Evidence for a bimodal expression of clinical and biological symptoms. *Am J Dis Child* 1960. 1990 Nov;144(11):1210–5.
31. Barnhart HX, Caldwell MB, Thomas P, Mascola L, Ortiz I, Hsu HW, et al. Natural history of human immunodeficiency virus disease in perinatally infected children: an analysis from the Pediatric Spectrum of Disease Project. *Pediatrics.* 1996 May;97(5):710–6.

32. Goulder PJ, Lewin SR, Leitman EM. Paediatric HIV infection: the potential for cure. *Nat Rev Immunol*. 2016 Apr;16(4):259–71.
33. Newell M-L, Coovadia H, Cortina-Borja M, Rollins N, Gaillard P, Dabis F, et al. Mortality of infected and uninfected infants born to HIV-infected mothers in Africa: a pooled analysis. *Lancet Lond Engl*. 2004 Oct 2;364(9441):1236–43.
34. Newell M-L, Brahmbhatt H, Ghys PD. Child mortality and HIV infection in Africa: a review. *AIDS Lond Engl*. 2004 Jun;18 Suppl 2:S27-34.
35. Mphatswe W, Blanckenberg N, Tudor-Williams G, Prendergast A, Thobakgale C, Mkhwanazi N, et al. High frequency of rapid immunological progression in African infants infected in the era of perinatal HIV prophylaxis. *AIDS Lond Engl*. 2007 Jun 19;21(10):1253–61.
36. Paul ME, Mao C, Charurat M, Serchuck L, Foca M, Hayani K, et al. Predictors of immunologic long-term nonprogression in HIV-infected children: Implications for initiating therapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2005 Apr;115(4):848–55.
37. Muenchhoff M, Adland E, Karimanzira O, Crowther C, Pace M, Csala A, et al. Nonprogressing HIV-infected children share fundamental immunological features of nonpathogenic SIV infection. *Sci Transl Med*. 2016 Sep 28;8(358):358ra125.
38. Deeks SG, Lewin SR, Havlir DV. The end of AIDS: HIV infection as a chronic disease. *Lancet Lond Engl*. 2013 Nov 2;382(9903):1525–33.
39. Guaraldi G, Orlando G, Zona S, Menozzi M, Carli F, Garlassi E, et al. Premature age-related comorbidities among HIV-infected persons compared with the general population. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2011 Dec;53(11):1120–6.
40. Powles T, Robinson D, Stebbing J, Shamash J, Nelson M, Gazzard B, et al. Highly active antiretroviral therapy and the incidence of non-AIDS-defining cancers in people with HIV infection. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2009 Feb 20;27(6):884–90.
41. Effros RB, Fletcher CV, Gebo K, Halter JB, Hazzard WR, Horne FM, et al. Aging and infectious diseases: workshop on HIV infection and aging: what is known and future research directions. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2008 Aug 15;47(4):542–53.

42. Nasi M, De Biasi S, Gibellini L, Bianchini E, Pecorini S, Bacca V, et al. Ageing and inflammation in patients with HIV infection. *Clin Exp Immunol*. 2017 Jan;187(1):44–52.
43. Desai S, Landay A. Early immune senescence in HIV disease. *Curr HIV/AIDS Rep*. 2010 Feb;7(1):4–10.
44. Appay V, Sauce D. Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. *J Pathol*. 2008 Jan;214(2):231–41.
45. Younas M, Psomas C, Reynes J, Corbeau P. Immune activation in the course of HIV-1 infection: Causes, phenotypes and persistence under therapy. *HIV Med*. 2016 Feb;17(2):89–105.
46. Piatak M, Saag MS, Yang LC, Clark SJ, Kappes JC, Luk KC, et al. High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science*. 1993 Mar 19;259(5102):1749–54.
47. Cohen J, Torres C. HIV-associated cellular senescence: A contributor to accelerated aging. *Ageing Res Rev*. 2017 Jul;36:117–24.
48. Wiley CD, Kuehnemann C, Campisi J. ANTIRETROVIRAL THERAPY DRIVES MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION-ASSOCIATED SENESCENCE, PROMOTING LIPOATROPHY. *Innov Aging*. 2017 Jul 1;1(suppl_1):1226–1226.
49. Ganesin K, Noguera-Julian A, Zanchetta M, Del Bianco P, Petrara MR, Freguja R, et al. Premature aging and immune senescence in HIV-infected children. *AIDS Lond Engl*. 2016 Jun 1;30(9):1363–73.
50. Giorgi JV, Lyles RH, Matud JL, Yamashita TE, Mellors JW, Hultin LE, et al. Predictive value of immunologic and virologic markers after long or short duration of HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr 1999*. 2002 Apr 1;29(4):346–55.
51. Liu Z, Cumberland WG, Hultin LE, Prince HE, Detels R, Giorgi JV. Elevated CD38 antigen expression on CD8+ T cells is a stronger marker for the risk of chronic HIV disease progression to AIDS and death in the Multicenter AIDS Cohort Study than CD4+ cell count, soluble immune activation markers, or combinations of HLA-DR and CD38 expression. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirology Off Publ Int Retrovirology Assoc*. 1997 Oct 1;16(2):83–92.

52. Hunt PW, Martin JN, Sinclair E, Brecht B, Hagos E, Lampiris H, et al. T cell activation is associated with lower CD4+ T cell gains in human immunodeficiency virus-infected patients with sustained viral suppression during antiretroviral therapy. *J Infect Dis.* 2003 May 15;187(10):1534–43.
53. Kestens L, Vanham G, Gigase P, Young G, Hannel I, Vanlangendonck F, et al. Expression of activation antigens, HLA-DR and CD38, on CD8 lymphocytes during HIV-1 infection. *AIDS Lond Engl.* 1992 Aug;6(8):793–7.
54. Jaumdally SZ, Picton A, Tiemessen CT, Paximadis M, Jaspan HB, Gamielidien H, et al. CCR5 expression, haplotype and immune activation in protection from infection in HIV-exposed uninfected individuals in HIV-serodiscordant relationships. *Immunology.* 2017;151(4):464–73.
55. Mangano A, Gonzalez E, Dhanda R, Catano G, Bamshad M, Bock A, et al. Concordance between the CC chemokine receptor 5 genetic determinants that alter risks of transmission and disease progression in children exposed perinatally to human immunodeficiency virus. *J Infect Dis.* 2001 Jun 1;183(11):1574–85.
56. Westendorp MO, Frank R, Ochsenbauer C, Stricker K, Dhein J, Walczak H, et al. Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120. *Nature.* 1995 Jun 8;375(6531):497–500.
57. Katsikis PD, Wunderlich ES, Smith CA, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Fas antigen stimulation induces marked apoptosis of T lymphocytes in human immunodeficiency virus-infected individuals. *J Exp Med.* 1995 Jun 1;181(6):2029–36.
58. Sasaki Y, Ami Y, Nakasone T, Shinohara K, Takahashi E, Ando S, et al. Induction of CD95 ligand expression on T lymphocytes and B lymphocytes and its contribution to apoptosis of CD95-up-regulated CD4+ T lymphocytes in macaques by infection with a pathogenic simian/human immunodeficiency virus. *Clin Exp Immunol.* 2000 Dec;122(3):381–9.
59. 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 Lond Engl.* 2017 01;31 Suppl 2:S105–19.

60. Pawelec G, Effros RB, Caruso C, Remarque E, Barnett Y, Solana R. T cells and aging (update february 1999). *Front Biosci J Virtual Libr.* 1999 Mar 1;4:D216-269.
61. Kared H, Martelli S, Ng TP, Pender SLF, Larbi A. CD57 in human natural killer cells and T-lymphocytes. *Cancer Immunol Immunother Cll.* 2016 Apr;65(4):441–52.
62. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J.* 1992 Nov;11(11):3887–95.
63. Trautmann L, Janbazian L, Chomont N, Said EA, Gimmig S, Bessette B, et al. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat Med.* 2006 Oct;12(10):1198–202.
64. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med.* 2000 Oct 2;192(7):1027–34.
65. Tandon R, Giret MTM, Sengupta D, York VA, Wiznia AA, Rosenberg MG, et al. Age-related expansion of Tim-3 expressing T cells in vertically HIV-1 infected children. *PloS One.* 2012;7(9):e45733.
66. Côté HCF, Soudeyns H, Thorne A, Alimenti A, Lamarre V, Maan EJ, et al. Leukocyte Telomere Length in HIV-Infected and HIV-Exposed Uninfected Children: Shorter Telomeres with Uncontrolled HIV Viremia. *PLOS ONE.* 2012 Jul 16;7(7):e39266.
67. Chiappini E, Bianconi M, Dalzini A, Petrara MR, Galli L, Giaquinto C, et al. Accelerated aging in perinatally HIV-infected children: clinical manifestations and pathogenetic mechanisms. *Aging.* 2018 Nov 11;10(11):3610–25.
68. Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002 May 15;30(10):e47.
69. Zhang X, Lou X, Xia F. Advances in the detection of telomerase activity using isothermal amplification. *Theranostics.* 2017 Apr 10;7(7):1847–62.

70. Ludlow AT, Robin JD, Sayed M, Litterst CM, Shelton DN, Shay JW, et al. Quantitative telomerase enzyme activity determination using droplet digital PCR with single cell resolution. *Nucleic Acids Res.* 2014 Jul;42(13):e104.
71. Jain V, Hartogensis W, Bacchetti P, Hunt PW, Hatano H, Sinclair E, et al. Antiretroviral therapy initiated within 6 months of HIV infection is associated with lower T-cell activation and smaller HIV reservoir size. *J Infect Dis.* 2013 Oct 15;208(8):1202–11.
72. Violari A, Cotton MF, Gibb DM, Babiker AG, Steyn J, Madhi SA, et al. Early antiretroviral therapy and mortality among HIV-infected infants. *N Engl J Med.* 2008 Nov 20;359(21):2233–44.
73. Chan MK, Goodall R, Judd A, Klein N, Chiappini E, Klimkait T, et al. Predictors of faster virological suppression in early treated infants with perinatal HIV from Europe and Thailand. *AIDS Lond Engl.* 2019 Feb 7;
74. Puthanakit T, Saphonn V, Ananworanich J, Kosalaraksa P, Hansudewechakul R, Vibol U, et al. Early versus deferred antiretroviral therapy for children older than 1 year infected with HIV (PREDICT): a multicentre, randomised, open-label trial. *Lancet Infect Dis.* 2012 Dec;12(12):933–41.
75. Desmonde S, Dicko F, Koueta F, Eboua T, Balestre E, Amani-Bosse C, et al. Association between age at antiretroviral therapy initiation and 24-month immune response in HIV-infected children in West Africa. *AIDS Lond Engl.* 2014 Jul 17;28(11):1645–55.
76. Picat M-Q, Lewis J, Musiime V, Prendergast A, Nathoo K, Kekitiinwa A, et al. Predicting patterns of long-term CD4 reconstitution in HIV-infected children starting antiretroviral therapy in sub-Saharan Africa: a cohort-based modelling study. *PLoS Med.* 2013 Oct;10(10):e1001542.
77. Patel K, Hernán MA, Williams PL, Seeger JD, McIntosh K, Dyke RBV, et al. Long-term effects of highly active antiretroviral therapy on CD4+ cell evolution among children and adolescents infected with HIV: 5 years and counting. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2008 Jun 1;46(11):1751–60.
78. Weinberg A, Dickover R, Britto P, Hu C, Patterson-Bartlett J, Kraimer J, et al. Continuous improvement in the immune system of HIV-infected children on prolonged antiretroviral therapy. *AIDS Lond Engl.* 2008 Nov 12;22(17):2267–77.

79. Pensieroso S, Cagigi A, Palma P, Nilsson A, Capponi C, Freda E, et al. Timing of HAART defines the integrity of memory B cells and the longevity of humoral responses in HIV-1 vertically-infected children. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 May 12;106(19):7939–44.
80. Cotugno N, Douagi I, Rossi P, Palma P. Suboptimal immune reconstitution in vertically HIV infected children: a view on how HIV replication and timing of HAART initiation can impact on T and B-cell compartment. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:805151.
81. Dziuban EJ, Rivadeneira ED. Universal Antiretroviral Treatment Eligibility for Children and Adolescents Living with HIV: A New Era. *Pediatr Infect Dis J*. 2016 Jun 10;
82. Yin DE, Warshaw MG, Miller WC, Castro H, Fiscus SA, Harper LM, et al. Using CD4 percentage and age to optimize pediatric antiretroviral therapy initiation. *Pediatrics*. 2014 Oct;134(4):e1104-1116.
83. Weigel R, Phiri S, Chiputula F, Gumulira J, Brinkhof M, Gsponer T, et al. Growth response to antiretroviral treatment in HIV-infected children: a cohort study from Lilongwe, Malawi. *Trop Med Int Health TM IH*. 2010 Aug;15(8):934–44.
84. Gsponer T, Weigel R, Davies M-A, Bolton C, Moultrie H, Vaz P, et al. Variability of growth in children starting antiretroviral treatment in southern Africa. *Pediatrics*. 2012 Oct;130(4):e966-977.
85. Musoke PM, Mudiope P, Barlow-Mosha LN, Ajuna P, Bagenda D, Mubiru MM, et al. Growth, immune and viral responses in HIV infected African children receiving highly active antiretroviral therapy: a prospective cohort study. *BMC Pediatr*. 2010;10:56.
86. Sutcliffe CG, Moss WJ. Do children infected with HIV receiving HAART need to be revaccinated? *Lancet Infect Dis*. 2010 Sep;10(9):630–42.
87. Moss, W, Halsey, N. Vaccination of human immunodeficiency virus-infected persons. In: *Vaccine*. 5th Edition. Philadelphia, PA; 2008.
88. Moss WJ, Scott S, Mugala N, Ndhlovu Z, Beeler JA, Audet SA, et al. Immunogenicity of standard-titer measles vaccine in HIV-1-infected and uninfected Zambian children: an observational study. *J Infect Dis*. 2007 Aug 1;196(3):347–55.

89. Mehta N, Cunningham CK, Flynn P, Pepe J, Obaro S, Kapogiannis BG, et al. Impaired generation of hepatitis B virus-specific memory B cells in HIV infected individuals following vaccination. *Vaccine*. 2010 May 7;28(21):3672–8.
90. Abzug MJ, Qin M, Levin MJ, Fenton T, Beeler JA, Bellini WJ, et al. Immunogenicity, immunologic memory, and safety following measles revaccination in HIV-infected children receiving highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis*. 2012 Aug 15;206(4):512–22.
91. Abzug MJ, Song LY, Levin MJ, Nachman SA, Borkowsky W, Pelton SI, et al. Antibody persistence and immunologic memory after sequential pneumococcal conjugate and polysaccharide vaccination in HIV-infected children on highly active antiretroviral therapy. *Vaccine*. 2013 Oct 1;31(42):4782–90.
92. Zaccarelli-Filho CA, Ono E, Machado DM, Brunialti M, Succi RC de M, Salomão R, et al. HIV-1-infected children on HAART: immunologic features of three different levels of viral suppression. *Cytometry B Clin Cytom*. 2007 Jan 15;72(1):14–21.
93. Siberry GK, Patel K, Bellini WJ, Karalius B, Purswani MU, Burchett SK, et al. Immunity to Measles, Mumps, and Rubella in US Children With Perinatal HIV Infection or Perinatal HIV Exposure Without Infection. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2015 Sep 15;61(6):988–95.
94. Rainwater-Lovett K, Moss WJ. Immunologic basis for revaccination of HIV-infected children receiving HAART. *Future Virol*. 2011 Jan 1;6(1):59–71.
95. Guia de Imunização SBIm/SBI – HIV/Aids 2016/2017 - SBIm [Internet]. [cited 2019 Feb 26]. Available from: <https://sbim.org.br/publicacoes/guias/567-guia-de-imunizacao-sbim-sbi-hiv-aids-2016-2017>
96. Succi RCM, Krauss MR, Harris DR, Machado DM, de Moraes-Pinto MI, Mussi-Pinhata MM, et al. Undervaccination of perinatally HIV-infected and HIV-exposed uninfected children in Latin America and the Caribbean. *Pediatr Infect Dis J*. 2013 Aug;32(8):845–50.
97. Zinna S, Bamford A, Cunnington A, Kampmann B, Lyall E, Menson E, et al. Immunization status of children with HIV: failure to protect a vulnerable population. *HIV Med*. 2011 Aug;12(7):447–8.

98. Harris PA, Taylor R, Thielke R, Payne J, Gonzalez N, Conde JG. Research electronic data capture (REDCap)--a metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support. *J Biomed Inform.* 2009 Apr;42(2):377–81.
99. Organização Pan-Americana da Saúde. OPS/OMS Boas Práticas Clínicas: Documento das Américas. [Internet]. 2005. Available from: http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/pesquisa/boaspraticas_americas.pdf
100. World Health Organization. WHO child growth standards: length/height-for-age, weight-for-age, weight-for-length, weight-forheight and body mass index-for-age: methods and development. 2006.
101. de Onis M, Onyango AW, Borghi E, Siyam A, Nishida C, Siekmann J. Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. *Bull World Health Organ.* 2007 Sep;85(9):660–7.
102. Howie SR. Blood sample volumes in child health research: review of safe limits. *Bull World Health Organ.* 2011 Jan 1;89(1):46–53.
103. Charles A Janeway, Paul Travers, Mark Walport e Mark Shlochik; Tradução Cristina Bonorino. *Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença*. 5a edição. Artmed; 2002.
104. Van Dyke RB, Patel K, Siberry GK, Burchett SK, Spector SA, Chernoff MC, et al. Antiretroviral treatment of US children with perinatally acquired HIV infection: temporal changes in therapy between 1991 and 2009 and predictors of immunologic and virologic outcomes. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999. 2011 Jun 1;57(2):165–73.
105. 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 May;10(5):e1004078.
106. Sainz T, Serrano-Villar S, Díaz L, González Tomé MI, Gurbindo MD, de José MI, et al. The CD4/CD8 ratio as a marker T-cell activation, senescence and activation/exhaustion in treated HIV-infected children and young adults. *AIDS Lond Engl.* 2013 Jun 1;27(9):1513–6.

107. Serrano-Villar S, Moreno S, Fuentes-Ferrer M, Sánchez-Marcos C, Avila M, Sainz T, et al. The CD4:CD8 ratio is associated with markers of age-associated disease in virally suppressed HIV-infected patients with immunological recovery. *HIV Med.* 2014 Jan;15(1):40–9.
108. Serrano-Villar S, Gutiérrez C, Vallejo A, Hernández-Novoa B, Díaz L, Abad Fernández M, et al. The CD4/CD8 ratio in HIV-infected subjects is independently associated with T-cell activation despite long-term viral suppression. *J Infect.* 2013 Jan;66(1):57–66.
109. Alvarez P, Mwamzuka M, Marshed F, Kravietz A, Ilmet T, Ahmed A, et al. Immune activation despite preserved CD4 T cells in perinatally HIV-infected children and adolescents. *PLoS One.* 2017;12(12):e0190332.
110. McBride JA, Striker R. Imbalance in the game of T cells: What can the CD4/CD8 T-cell ratio tell us about HIV and health? *PLoS Pathog.* 2017;13(11):e1006624.
111. van den Heuvel D, Driessen GJA, Berkowska MA, van der Burg M, Langerak AW, Zhao D, et al. Persistent subclinical immune defects in HIV-1-infected children treated with antiretroviral therapy. *AIDS Lond Engl.* 2015 Sep 10;29(14):1745–56.
112. Montesano C, Anselmi A, Palma P, Bernardi S, Cicconi R, Mattei M, et al. HIV replication leads to skewed maturation of CD8-positive T-cell responses in infected children. *New Microbiol.* 2010 Oct;33(4):303–9.
113. Mansoor N, Abel B, Scriba TJ, Hughes J, de Kock M, Tameris M, et al. Significantly skewed memory CD8+ T cell subsets in HIV-1 infected infants during the first year of life. *Clin Immunol.* 2009 Mar;130(3):280–9.
114. Azzoni L, Barbour R, Papasavvas E, Glencross DK, Stevens WS, Cotton MF, et al. Early ART Results in Greater Immune Reconstitution Benefits in HIV-Infected Infants: Working with Data Missingness in a Longitudinal Dataset. *PLoS One.* 2015;10(12):e0145320.
115. Díaz L, Méndez-Lagares G, Correa-Rocha R, Pacheco YM, Ferrando-Martínez S, Ruiz-Mateos E, et al. Detectable viral load aggravates immunosenescence features of CD8 T-cell subsets in vertically HIV-infected children. *J Acquir Immune Defic Syndr 1999.* 2012 Aug 15;60(5):447–54.

116. Viganò A, Pinti M, Nasi M, Moretti L, Balli F, Mussini C, et al. Markers of cell death-activation in lymphocytes of vertically HIV-infected children naive to highly active antiretroviral therapy: the role of age. *J Allergy Clin Immunol*. 2001 Sep;108(3):439–45.
117. Plaeger-Marshall S, Isacescu V, O'Rourke S, Bertolli J, Bryson YJ, Stiehm ER. T cell activation in pediatric AIDS pathogenesis: three-color immunophenotyping. *Clin Immunol Immunopathol*. 1994 Apr;71(1):19–26.
118. Debatin KM, Fahrig-Faissner A, Enenkel-Stoodt S, Kreuz W, Benner A, Krammer PH. High expression of APO-1 (CD95) on T lymphocytes from human immunodeficiency virus-1-infected children. *Blood*. 1994 May 15;83(10):3101–3.
119. Foldi J, Kozhaya L, McCarty B, Mwamzuka M, Marshed F, Ilmet T, et al. HIV-Infected Children Have Elevated Levels of PD-1+ Memory CD4 T Cells With Low Proliferative Capacity and High Inflammatory Cytokine Effector Functions. *J Infect Dis*. 2017 Sep 15;216(6):641–50.
120. Cockerham LR, Jain V, Sinclair E, Glidden DV, Hartogenesis W, Hatano H, et al. Programmed death-1 expression on CD4⁺ and CD8⁺ T cells in treated and untreated HIV disease. *AIDS Lond Engl*. 2014 Jul 31;28(12):1749–58.
121. Méndez-Lagares G, Díaz L, Correa-Rocha R, León Leal JA, Ferrando-Martínez S, Ruiz-Mateos E, et al. Specific patterns of CD4-associated immunosenescence in vertically HIV-infected subjects. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2013 Jun;19(6):558–65.
122. 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 May;28(5):465–8.
123. Zakhour R, Tran DQ, Heresi GP, Degaffe G, Bell CS, Donnachie E, et al. CD31 Expression on CD4⁺ Cells: A Simple Method for Quantitation of Recent Thymus Emigrant CD4 Cells. *Am J Trop Med Hyg*. 2016 Oct 5;95(4):970–2.

124. Zakhour R, Tran DQ, Degaffe G, Bell CS, Donnachie E, Zhang W, et al. Recent Thymus Emigrant CD4+ T Cells Predict HIV Disease Progression in Patients With Perinatally Acquired HIV. *Clin Infect Dis*. 2016 Apr 15;62(8):1029–35.
125. Crisinel PA, Posfay-Barbe KM, Aebi C, Cheseaux J-J, Kahlert C, Rudin C, et al. Determinants of hepatitis A vaccine immunity in a cohort of human immunodeficiency virus-infected children living in Switzerland. *Clin Vaccine Immunol CVI*. 2012 Nov;19(11):1751–7.
126. WHO | Weekly Epidemiological Record, 7 July 2017, vol. 92, 27 (pp. 369–392) [Internet]. WHO. [cited 2019 Apr 5]. Available from: <http://www.who.int/wer/2017/wer9227/en/>
127. Abramczuk BM, Mazzola TN, Moreno YMF, Zorzeto TQ, Quintilio W, Wolf PS, et al. Impaired humoral response to vaccines among HIV-exposed uninfected infants. *Clin Vaccine Immunol CVI*. 2011 Sep;18(9):1406–9.
128. Lima M, De Menezes Succi RC, Nunes Dos Santos AM, Weckx LY, De Moraes-Pinto MI. Rubella immunization in human immunodeficiency virus type 1-infected children: cause for concern in vaccination strategies. *Pediatr Infect Dis J*. 2004 Jul;23(7):604–7.
129. Milagres LG, Costa PR, Santos BAN, Silva GP, Cruz AC, Pereira-Manfro WF, et al. CD4+ T-cell activation impairs serogroup C *Neisseria meningitidis* vaccine response in HIV-infected children. *AIDS Lond Engl*. 2013 Nov 13;27(17):2697–705.
130. del Pozo Balado M del M, Leal M, Méndez Lagares G, Mata RC, López-Cortés LF, Viciano P, et al. Increased regulatory T cell counts in HIV-infected nonresponders to hepatitis B virus vaccine. *J Infect Dis*. 2010 Aug 15;202(3):362–9.
131. Milagres LG, Costa PR, Silva GP, Carvalho KI, Pereira-Manfro WF, Ferreira B, et al. Subsets of memory CD4+ T cell and bactericidal antibody response to *Neisseria meningitidis* serogroup C after immunization of HIV-infected children and adolescents. *PloS One*. 2014;9(12):e115887.

132. A.C. Frota, L. Milagres, B. Ferreira, D. MennaBarreto, G. Pereira, R. de Castro, L. Harrison, L. Evangelista, T. Abreu, R. de Oliveira, C., Barroso Hofer. Long-term maintenance of undetectable viral is associated with better response to immunization with *Neisseria meningitidis* C conjugated vaccine among HIV vertically-infected children, in Rio de Janeiro, Brazil. Durban, South Africa; 2016. Report No.: TUPEB100.
133. Card CM, McLaren PJ, Wachihi C, Kimani J, Plummer FA, Fowke KR. Decreased immune activation in resistance to HIV-1 infection is associated with an elevated frequency of CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells. *J Infect Dis.* 2009 May 1;199(9):1318–22.
134. Legrand FA, Nixon DF, Loo CP, Ono E, Chapman JM, Miyamoto M, et al. Strong HIV-1-specific T cell responses in HIV-1-exposed uninfected infants and neonates revealed after regulatory T cell removal. *PLoS One.* 2006 Dec 20;1:e102.
135. Kessler PA. Potential role of regulatory T cells in mother-to-child transmission of HIV. *Curr HIV Res.* 2019 Feb 12;
136. Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:531–62.
137. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003 Apr;4(4):330–6.
138. Yu N, Li X, Song W, Li D, Yu D, Zeng X, et al. CD4(+)CD25 (+)CD127 (low/-) T cells: a more specific Treg population in human peripheral blood. *Inflammation.* 2012 Dec;35(6):1773–80.
139. Ndhlovu LC, Loo CP, Spotts G, Nixon DF, Hecht FM. FOXP3 expressing CD127lo CD4+ T cells inversely correlate with CD38+ CD8+ T cell activation levels in primary HIV-1 infection. *J Leukoc Biol.* 2008 Feb;83(2):254–62.
140. Chevalier MF, Weiss L. The split personality of regulatory T cells in HIV infection. *Blood.* 2013 Jan 3;121(1):29–37.
141. Rosado-Sánchez I, Jarrín I, Pozo-Balado MM, de Pablo-Bernal RS, Herrero-Fernández I, Alvarez-Ríos AI, et al. Higher levels of IL-6, CD4 turnover and Treg frequency are already present before cART in HIV-infected subjects with later low CD4 recovery. *Antiviral Res.* 2017;142:76–82.

142. Khaitan A, Kravietz A, Mwamzuka M, Marshed F, Ilmet T, Said S, et al. FOXP3+Helios+ Regulatory T Cells, Immune Activation, and Advancing Disease in HIV-Infected Children. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999. 2016 Aug 15;72(5):474–84.
143. Cobos Jiménez V, Wit FWNM, Joerink M, Maurer I, Harskamp AM, Schouten J, et al. T-Cell Activation Independently Associates With Immune Senescence in HIV-Infected Recipients of Long-term Antiretroviral Treatment. *J Infect Dis*. 2016 Jul 15;214(2):216–25.
144. Freguja R, Gianesin K, Mosconi I, Zanchetta M, Carmona F, Rampon O, et al. Regulatory T cells and chronic immune activation in human immunodeficiency virus 1 (HIV-1)-infected children. *Clin Exp Immunol*. 2011 Jun;164(3):373–80.