

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**Biomarcadores de risco cardiovascular em pacientes
HIV positivos tratados e não tratados com terapia
antirretroviral**

Luciane Marzzullo Cicarelli

São Paulo
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**Biomarcadores de risco cardiovascular em pacientes
HIV positivos tratados e não tratados com terapia
antirretroviral**

Luciane Marzzullo Cicarelli

Tese para Obtenção do Título de DOUTOR

Orientadora:

Prof^a Dr^a Dulcineia Saes Parra Abdalla

São Paulo

2016

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Cicarelli, Luciane Marzzullo
C568b Biomarcadores de risco cardiovascular em pacientes HIV
positivos tratados e não tratados com terapia antirretroviral /
Luciane Marzzullo Cicarelli. -- São Paulo, 2016.
92p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Abdalla, Dulcinéia Saes Parra

1. Arteriosclerose 2. HIV 3. Biomarcadores I. T. II. Abdalla,
Dulcinéia Saes Parra, orientador.

616.136 CDD

Luciane Marzzullo Cicarelli

**Biomarcadores de risco cardiovascular em pacientes
HIV positivos tratados e não tratados com terapia
antirretroviral**

Versão Original

Comissão Julgadora da Tese para Obtenção do Título de DOUTOR

Prof^a Dr^a Dulcineia Saes Parra Abdalla
Orientadora / Presidente

1º examinador

2º examinador

3º examinador

4º examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2016.

Na vida, nada deve ser temido,
apenas compreendido.

Marie Curie (1867 – 1934)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Milton e Maria Darque, pelo incentivo ao estudo sempre.

Ao meu amado, Domingos, pelo amor e companhia imprescindíveis para meu viver.

À minha filha, Ana Carolina, que completa minha vida com sua existência e alegria.

AGRADECIMENTOS

À Profª Drª Dulcineia Saes Parra Abdalla, pelo pensar crítico, reflexivo e construtivo para a elaboração e a concretização deste sonho, pelo incentivo ao desenvolvimento acadêmico e pessoal, muito obrigada.

Aos amigos de pós-graduação do Laboratório de Bioquímica Clínica, Departamento de Análises Clínicas da FCF-USP, Tanize do E. S. Faulin, pelas orientações no início deste estudo; Marcela F. Cavalcante, pelas orientações e auxílio na elaboração das figuras e na estruturação da apresentação gráfica deste estudo; Soraya M. Kazuma, pelas figuras dos ELISAs; Camila C. Tierno, pelo sorriso largo e incentivador; Elaine M. Augusto, pelo auxílio e dedicação na padronização e realização dos ELISAs; Jacqueline Cavalcante, pelo incentivo e auxílio na elaboração dos gráficos; Walter Turato, Gustavo, Guilherme, Mayara, Matina e Felipe, obrigada pela companhia nesta caminhada. À Verônica S. de Oliveira, pelo incentivo à conclusão desta caminhada.

À Profª Drª Marina Baquerizo Martinez, pelo incentivo ao desenvolvimento acadêmico e profissional, pelo pensar crítico e construtivo na consolidação de um saber em Análises Clínicas, aplicável à assistência, ao ensino e à pesquisa, obrigada.

À Profª Drª Ana Campa, pelo pensar reflexivo e seguro na construção do conhecimento pessoal, acadêmico e profissional. À Profª Drª Elvira M. G. Shinohara e ao Prof Dr Itamar de S. Santos, pelas aulas de estatística que muito auxiliaram para a conclusão deste estudo. Ao Prof Paulo A. Lotufo, pelas críticas e sugestões para este estudo. Ao Prof Dr Ricardo A. Fock, pela continuidade das minhas atividades profissionais e acadêmicas.

Aos grandes amigos da Divisão de Laboratório Clínico do HU-USP, pelo incentivo à realização e conclusão deste trabalho, Iára Turrin, Juliana B. de Andrade, Ligia M. G. Fedeli, Sueli S. Pansica, Daniela Y. Kayanuma, Marta R. Juncioni, Célia, Daniela, Renata, Lucilene, Valéria, Mayara, Thiago, Elenice, Lilian, Silvia, Daniel G. Ferreira, Vanda C. Gutierrez e todos demais colegas que não foram citados nominalmente, mas que moram no meu coração com seus sorrisos e com sua dedicação à assistência de excelência.

Aos pacientes e voluntários que doaram um pouco de si e permitiram a realização deste estudo.

SUMÁRIO

Dedicatória

Agradecimentos

Sumário

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas e siglas

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	1
2. PROCESSO DA ATEROSCLEROSE	5
2.1. PROCESSO DA ATEROSCLEROSE EM PACIENTES HIV POSITIVOS	6
3. BIOMARCADORES DE RISCO CARDIOVASCULAR	12
3.1. BIOMARCADORES DE MODIFICAÇÃO LIPÍDICA	13
3.1.1. LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE ELETRONEGATIVA [LDL(-)]	13
3.1.2. FORMAS OXIDADAS DA LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE	16
3.2. BIOMARCADORES DE RESPOSTA IMUNE-INFLAMATÓRIA E ESTRESSE OXIDATIVO	18
3.2.1. ANTICORPOS ANTI-LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE ELETRONEGATIVA [ANTI-LDL(-)]	18
3.2.2. IMUNOCOMPLEXOS ANTI-LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE ELETRONEGATIVA [IC-LDL(-)]	21
3.2.3. PROTEÍNA AMILÓIDE SÉRICA A (SAA)	21
3.2.4. MIELOPEROXIDASE (MPO)	22
3.3. BIOMARCADORES DE COMPOSIÇÃO PROTEICA DE LIPOPROTEÍNAS	24
3.3.1. APOLIPOPROTEÍNA A-I (ApoA-I)	24
3.3.2. APOLIPOPROTEÍNA B (ApoB)	25
3.3.3. APOLIPOPROTEÍNA E (ApoE)	25
4. OBJETIVOS	26

5. CASUÍSTICA E MÉTODOS	27
6. RESULTADOS	43
7. DISCUSSÃO	58
8. CONCLUSÕES	67
9. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	68
ANEXO I	76
ANEXO II	77
ANEXO III	83
ANEXO IV	85
ANEXO V	88

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Incidência de Aids e Número de Óbitos por Aids no Brasil, no Período de 1990 a 2009.	3
FIGURA 2: Fatores Determinantes de Doença Cardiovascular em Indivíduos com Infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (adaptado de: BELTRÁN et al., 2015).	7
FIGURA 3: Mecanismos Propostos para o Processo da Aterosclerose em Indivíduos com Infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (adaptado de: CROWE et al., 2010).	9
FIGURA 4: Modificações Aterogênicas da Lipoproteína de Baixa Densidade e a Formação da Lipoproteína de Baixa Densidade Eletronegativa (adaptado de: IVANOVA; BOBRY SHEV; OREKHOV, 2015).	15
FIGURA 5: Mecanismos Propostos para o Processo de Produção de Autoanticorpos e Imunocomplexos de Lipoproteína de Baixa Densidade Eletronegativa na Aterogênese (adaptado de: MELLO et al., 2011).	19
FIGURA 6: Representação Esquemática do Ensaio Imunoenzimático para Determinação de Lipoproteína de Baixa Densidade Eletronegativa.	30
FIGURA 7: Representação Esquemática dos Ensaios Imunoenzimáticos para Determinações de Autoanticorpos IgG e IgM Anti-Lipoproteína de Baixa Densidade Eletronegativa.	34
FIGURA 8: Representação Esquemática do Ensaio Imunoenzimático para Determinação de Imunocomplexos de Lipoproteína de Baixa Densidade Eletronegativa.	37

FIGURA 9: Perfil Lipêmico para Grupos Controle (n= 32), HIV-NT (n= 28) e HIV-TARV (n=29).	43
FIGURA 10: Concentração de Proteína C Reativa para Grupos Controle (n= 32), HIV-NT (n= 28) e HIV-TARV (n=29).	44
FIGURA 11: Espessura da Camada Média-Íntima das Artérias Carótidas Direita e Esquerda para Grupos Controle (n= 32), HIV-NT (n= 28) e HIV-TARV (n=29).	44
FIGURA 12: Curvas de Calibração Obtidas para ELISA de Autoanticorpos IgG e IgM Anti-LDL(-) com Placas Sensibilizadas com 0,5µg/mL de LDL(-) e Avaliação do Conjugado com Peroxidase (A) título 1/500, (B) título 1/1000, (C) título 1/2000 e (D) título 1/4000.	45
FIGURA 13: Curvas de Calibração Obtidas para ELISA de Autoanticorpos IgG e IgM Anti-LDL(-) com Placas Sensibilizadas com 1µg/mL de LDL(-) e Avaliação do Conjugado com Peroxidase (A) título 1/500, (B) título 1/1000, (C) título 1/2000 e (D) título 1/4000.	46
FIGURA 14: Curvas de Calibração Obtidas para ELISA de Autoanticorpos IgG e IgM Anti-LDL(-) com Placas Sensibilizadas com 2µg/mL de LDL(-) e Avaliação do Conjugado com Peroxidase (A) título 1/500, (B) título 1/1000, (C) título 1/2000 e (D) título 1/4000.	46
FIGURA 15: Curvas de Calibração Obtidas para ELISA de IC-LDL(-) com Placas Sensibilizadas com Fab do MAbs 2C7D5F10 (A) 10µg/mL, (B) 5µg/mL e (C) 2,5µg/mL.	48
FIGURA 16: Curvas de Calibração Obtidas para ELISA de IC-LDL(-) com Placas Sensibilizadas com 10µg/mL de Fab do MAbs 2C7D5F10 e Avaliação do Conjugado com Peroxidase (A) título 1/2000, (B) título 1/4000 e (C) título 1/8000.	48

FIGURA 17: Distribuição das Concentrações de LDL(-), IC-LDL(-), Anticorpos Anti-LDL(-)-IgG e Anti-LDL(-)-IgM (mg/L) para Grupos Controle (n= 32), HIV-NT (n= 28) e HIV-TARV (n= 29).	50
FIGURA 18: Distribuição das Concentrações de LDL-oxidada (UI/L), LDL-HNE e LDL-CML (mg/L) para Grupos Controle (n= 32), HIV-NT (n=28) e HIV-TARV (n= 29).	51
FIGURA 19: Distribuição das Concentrações de SAA e MPO (mg/L) para Grupos Controle (n= 32), HIV-NT (n= 28) e HIV-TARV (n= 29).	52
FIGURA 20: Distribuição das Concentrações de ApoA-I, ApoB e ApoE (mg/L) para Grupos Controle (n= 32), HIV-NT (n= 28) e HIV-TARV (n=29).	53
FIGURA 21: Dispersão da Correlação entre Concentrações de LDL(-) e IC-LDL(-) (mg/L em escala \log_{10}).	53
FIGURA 22: Dispersão das Correlações entre Concentrações de LDL-CML (mg/L) e Biomarcadores (A) LDL(-) (mg/L), (B) IC-LDL(-) (mg/L), (C) LDL-oxi (UI/L) e (D) LDL-HNE (mg/L).	54
FIGURA 23: Dispersão das Correlações entre Concentrações de Anticorpos Anti-LDL(-)-IgG (mg/L em escala \log_{10}) e (A) IC-LDL(-) (mg/L em escala \log_{10}) e (B) Anticorpos Anti-LDL(-)-IgM (mg/L em escala \log_{10}). .	55
FIGURA 24: Dispersão das Correlações entre Concentrações de ApoA-I (mg/L) e (A) ApoB (mg/L) e (B) ApoE (mg/L) e entre Concentrações de (C) ApoB e ApoE (mg/L).	56

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Biomarcadores Tradicionais, Não Tradicionais e Emergentes Relacionados com a Avaliação de Risco Cardiovascular.	12
TABELA 2: Combinações de Terapias Antirretrovirais Utilizadas pelos Indivíduos com Infecção pelo HIV (Grupo HIV-TARV).	28
TABELA 3: Biomarcadores Emergentes e Não Tradicionais de Risco Cardiovascular em Indivíduos com Infecção pelo HIV, Tratados e Não Tratados com Terapia Antirretroviral.	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aids: síndrome da imunodeficiência adquirida

ANOVA: análise de variância

Anti-LDL(-)-IgG: autoanticorpos da classe IgG anti-lipoproteína de baixa de densidade eletronegativa

Anti-LDL(-)-IgM: autoanticorpos da classe IgM anti-lipoproteína de baixa de densidade eletronegativa

Anti-LDL(-): autoanticorpos anti-lipoproteína de baixa de densidade eletronegativa

ApoA-I: apolipoproteína A-I

ApoB: apolipoproteína B

ApoB100: apolipoproteína B100

ApoCIII: apolipoproteína CIII

ApoE: apolipoproteína E

CML: carboximetila

Controle: indivíduo sem infecção pelo vírus da imunodeficiência humana

DCNT: doença crônica não transmissível

DCV: doença cardiovascular

DST: doenças sexualmente transmissíveis

ELISA: ensaio imunoenzimático

Fab: fragmento de ligação ao antígeno, porção Fab da molécula de anticorpo

Fc: fragmento cristalizável, porção Fc da molécula de anticorpo

FCF-USP: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

FPLC: cromatografia líquida rápida de proteínas

HDL: lipoproteína de alta densidade

HIV-NT: indivíduo com infecção pelo vírus da imunodeficiência humana não tratado com terapia antirretroviral

HIV-TARV: indivíduo com infecção pelo vírus da imunodeficiência humana tratado com terapia antirretroviral

HIV: vírus da imunodeficiência humana

HNE: 4-hidroxinonenal

HPLC: cromatografia líquida de alto desempenho

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IC-LDL(-): imunocomplexo de lipoproteína de baixa densidade eletronegativa

IgG: imunoglobulina G

IgM: imunoglobulina M

IL-1: interleucina 1

IL-6: interleucina 6

LDL-CML: lipoproteína de baixa densidade oxidada com resíduos de lisina da apolipoproteína B100 modificados por carboximetila

LDL-HNE: lipoproteína de baixa densidade oxidada com resíduos de lisina da apolipoproteína B100 modificados com 4-hidroxinonenal

LDL-oxi: lipoproteína de baixa densidade oxidada com resíduos de lisina da apolipoproteína B100 modificados com malondialdeído

LDL: lipoproteína de baixa densidade

LDL(-): lipoproteína de baixa densidade eletronegativa

LSD: menor diferença significativa

MAb: anticorpo monoclonal

MDA: malondialdeído

MMPs: metaloproteinases de matriz

MPO: mieloperoxidase

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato na forma reduzida

NEFAs: ácidos graxos não esterificados

OPD: o-fenilenediamina dihidrocloro, substrato para ELISA

PAF: fator ativador de plaquetas

PBS: solução salina tamponada com fosfato

PCR: proteína C reativa

RNA: ácido ribonucleico

rs: coeficiente de correlação de Spearman

SAA: proteína amilóide sérica A

TARV: tratamento ou terapia antirretroviral

Th1: resposta imune mediada por células

Th2: resposta imune humoral

TMB: 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, substrato para ELISA

RESUMO

CICARELLI, L. M. **Biomarcadores de risco cardiovascular em pacientes HIV positivos tratados e não tratados com terapia antirretroviral**. 2016. 92p. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

No advento dos antirretrovirais potentes, os indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) começaram a apresentar risco maior para o desenvolvimento de doença cardiovascular (DCV). Este aumento do risco cardiovascular pode ser associado tanto à infecção viral quanto ao tratamento antirretroviral (TARV), que provocam mudanças pró-aterogênicas como o aumento do colesterol total e da lipoproteína de baixa densidade (LDL), além da diminuição da lipoproteína de alta densidade (HDL). A ativação imune e as alterações lipídicas são mecanismos associados com a infecção pelo HIV e com o risco de DCV. Este trabalho utilizou ensaios imunoenzimáticos para a determinação plasmática de biomarcadores emergentes de risco cardiovascular relacionados com modificações da lipoproteína de baixa densidade, a saber: LDL eletronegativa [LDL(-)] e formas oxidadas da LDL, ou seja, LDL-oxi (resíduos lisina da apolipoproteína B100 modificados com malondialdeído), LDL-HNE (resíduos lisina da ApoB100 modificados com 4-hidroxinonenal) e LDL-CML (resíduos lisina da ApoB100 modificados por carboximetila), além de biomarcadores relacionados com a resposta imune-inflamatória, ou seja, autoanticorpos IgG e IgM anti-LDL(-), imunocomplexo de LDL(-) [IC-LDL(-)], proteína amiloide sérica A (SAA) e mieloperoxidase (MPO). Também foram determinadas as concentrações séricas dos biomarcadores de risco relacionados às apolipoproteínas: apolipoproteína A-I (ApoA-I), apolipoproteína B (ApoB) e apolipoproteína E (ApoE). A população estudada incluiu indivíduos com infecção pelo HIV, tratados (HIV-TARV) e não tratados (HIV-NT) com terapia antirretroviral e indivíduos sem infecção pelo HIV (controle). Não foram identificadas diferenças para as concentrações de LDL(-), IC-LDL(-), anti-LDL(-)-IgM, SAA, ApoA-I, ApoB e ApoE entre os grupos estudados (HIV-TARV, HIV-NT e controle). A ApoA-I correlacionou-se positivamente com ApoB e ApoE ($r_s = 0,418$ e $r_s = 0,347$, Spearman, $p < 0,01$) e a ApoB com a ApoE ($r_s = 0,286$, Spearman, $p < 0,01$). Verificou-se correlação inversa entre as concentrações de LDL(-) e IC-LDL(-) ($r_s = -0,214$, Spearman, $p < 0,05$). Os níveis de anti-LDL(-)-IgG correlacionaram-se positivamente com IC-LDL(-) e anti-LDL(-)-IgM ($r_s = 0,240$, Spearman, $p < 0,05$ e $r_s = 0,348$, Spearman, $p < 0,01$). As concentrações de LDL-CML correlacionaram-se positivamente com LDL(-), LDL-oxi, LDL-HNE e IC-LDL(-) ($r_s = 0,212$, Spearman, $p < 0,05$; $r_s = 0,214$, Spearman, $p < 0,05$; $r_s = 0,573$, Spearman, $p < 0,01$ e $r_s = 0,219$, Spearman, $p < 0,05$). O grupo HIV-NT apresentou níveis mais elevados de anticorpos anti-LDL(-)-IgG comparado ao grupo controle (Kruskal-Wallis, $p < 0,01$). Em contraste, observou-se no grupo HIV-NT diminuição das concentrações de MPO, LDL-HNE e LDL-CML em relação ao grupo controle (Kruskal-Wallis, $p < 0,01$). A comparação dos grupos HIV-NT e HIV-TARV demonstrou que o TARV promoveu diminuição das concentrações dos anticorpos anti-LDL(-)-IgG e aumentou os níveis de LDL-oxi (Kruskal-Wallis, $p < 0,01$). O grupo HIV-TARV apresentou aumento das concentrações de LDL-oxi e diminuição dos níveis de MPO, LDL-HNE e LDL-CML em relação ao controle (Kruskal-Wallis, $p < 0,01$). Em conclusão, a infecção pelo HIV modificou o biomarcador de inflamação MPO e o perfil de biomarcadores relacionados às modificações da LDL (menor formação de LDL-HNE e LDL-CML), além aumentar a resposta imune-humoral à LDL eletronegativa [anti-LDL(-)-IgG], enquanto o tratamento com antirretrovirais inibiu esta resposta. Os outros biomarcadores estudados não foram modificados pela infecção viral ou pelo tratamento antirretroviral.

Palavras-chave: Aterosclerose, HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana), Biomarcadores, LDL(-) (Lipoproteína de Baixa Densidade Eletronegativa), ELISA (Ensaio Imunoenzimático).

ABSTRACT

CICARELLI, L. M. **Biomarkers of cardiovascular risk in HIV-positive patients treated and untreated with antiretroviral therapy.** 2016. 92p. Thesis. Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2016.

In the advent of potent antiretroviral therapy, individuals infected with human immunodeficiency virus (HIV) have showed an increased risk for developing cardiovascular disease (DCV). Studies have discussed that the increased risk may be related to both the disease and antiretroviral treatment (TARV), that produced pro-atherogenic changes such as increased of total cholesterol and low density lipoprotein (LDL) and decreased high density lipoprotein. The immune activation and the lipid modifications are well known mechanisms related to HIV infection and the risk of DCV. This study used immunoassays for plasma quantification for emerging biomarkers of cardiovascular risk related to modification of low density lipoprotein: electronegative LDL [LDL(-)] and oxidized forms of LDL, LDL-oxi (lysine residues of apolipoprotein B100 modified by malondialdehyde), LDL-HNE (lysine residues of ApoB100 modified by 4-hydroxynonenal) and LDL-CML (lysine residues of ApoB100 modified by carboxymethyl) and biomarkers associated to immune and inflammatory responses, IgG and IgM autoantibodies anti-LDL(-) and immunocomplexes of LDL(-) [IC-LDL(-)], serum amyloid A protein (SAA) and myeloperoxidase (MPO). Also, were determined serum concentrations of risk biomarkers related to apolipoproteins: apolipoprotein A-I (ApoA-I), apolipoprotein B (ApoB) and apolipoprotein E (ApoE). The studied population included patients with HIV infection, treated (HIV-TARV) and untreated (HIV-NT) with antiretroviral therapy and individuals without HIV infection (controle). No differences were identified for concentrations of LDL(-), IC-LDL(-), anti-LDL(-)-IgM, SAA, ApoA-I, ApoB and ApoE between studied groups (HIV-TARV, HIV-NT and controle). The ApoA-I was positively correlated to ApoB and ApoE ($r_s = 0,418$ e $r_s = 0,347$, Spearman, $p < 0,01$) and ApoB to ApoE ($r_s = 0,286$, Spearman, $p < 0,01$). There was an inverted correlation between LDL(-) and IC-LDL(-) ($r_s = -0,214$, Spearman, $p < 0,05$). The levels of anti-LDL(-)-IgG were positively correlated to IC-LDL(-) and antibodies anti-LDL(-)-IgM ($r_s = 0,240$; Spearman; $p < 0,05$ and $r_s = 0,348$; Spearman; $p < 0,01$). The concentrations of LDL-CML were positively correlated to LDL(-), LDL-oxi, LDL-HNE e IC-LDL(-) ($r_s = 0,212$, Spearman, $p < 0,05$; $r_s = 0,214$, Spearman, $p < 0,05$; $r_s = 0,573$, Spearman, $p < 0,01$ e $r_s = 0,219$, Spearman, $p < 0,05$). The HIV-NT group showed higher levels of anti-LDL(-)-IgG compared to Control group (Kruskal-Wallis, $p < 0,01$). In contrast, was observed lower levels for HIV-NT group to MPO, LDL-HNE and LDL-CML when compared to Control group (Kruskal-Wallis, $p < 0,01$). The comparison of HIV-NT and HIV-TARV groups demonstrated that TARV caused a decrease of concentrations of anti-LDL(-)-IgG antibodies and an increased of LDL-oxi levels (Kruskal-Wallis, $p < 0,01$). The HIV-TARV group showed increased LDL-oxi concentrations and decreased at levels of MPO, LDL-HNE e LDL-CML when compared to Control (Kruskal-Wallis, $p < 0,01$). In conclusion, the HIV infection changed the biomarker of inflammation MPO and the profile of biomarkers related to modifications of LDL (lower concentrations of LDL-HNE and LDL-CML), as well as increased the humoral-immune response to electronegative LDL [anti-LDL(-)-IgG], while treatment with antiretroviral therapy inhibited this response. The other studied biomarkers were not modified either by viral infection or antiretroviral treatment.

Keywords: Atherosclerosis, HIV (Human Immunodeficiency Virus), Biomarkers, LDL(-) (Electronegative Low Density Lipoprotein), ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).

1.INTRODUÇÃO

Em regiões com acesso universal aos cuidados em saúde, o tratamento antirretroviral (TARV) melhorou o prognóstico dos indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), diminuindo a mortalidade relacionada com a síndrome da imunodeficiência adquirida (aids) e aumentando os casos de mortalidade devido a doença cardiovascular (DCV). Na Europa e América do Norte, houve diminuição de hospitalização por doenças relacionadas com aids e o aumento por doenças não relacionadas com aids, como a DCV. O TARV eficaz aumentou a idade média dos indivíduos com infecção pelo HIV, ampliando sua expectativa de vida e favorecendo o desenvolvimento de comorbidades associadas ao envelhecimento e a alterações cardiovasculares, como diabetes *mellitus* tipo 2, hipertensão, doença renal crônica e osteoporose (BELTRÁN et al., 2015; NOU et al., 2016a). Complicações cardiovasculares são mais comuns em indivíduos infectados com o HIV, do que em indivíduos não infectados com a mesma faixa etária (BJÖRKBACKA; FREDRIKSON; NILSSON, 2013; HSUE; DEEKS; HUNT, 2012).

Atualmente no Brasil, ocorre uma transição epidemiológica caracterizada por alterações no quadro populacional e de morbimortalidade. Na década de 50, as mortes por doenças infectocontagiosas correspondiam a 40% dos registros no País, hoje não ultrapassam 10%. O contrário ocorreu com as DCVs que correspondiam a 12% das mortes registradas na década de 1950 e hoje representam mais de 40% dos casos. Em um curto período de tempo, o Brasil mudou de um perfil de morbimortalidade típico de população jovem, para um perfil relacionado com enfermidades mais complexas, onerosas e crônicas, comuns de faixas etárias mais avançadas (GORDILHO et al., 2000).

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) são o problema de saúde pública de maior magnitude no País. Nas últimas décadas, o Brasil experimentou importantes transformações no seu padrão de mortalidade e morbidade, devido aos processos de transição demográfica, epidemiológica e nutricional, incluindo a urbanização e o crescimento econômico e social que também contribuem para o maior risco de desenvolvimento de DCNT pela população. Houve importante redução de doenças infecciosas e aumento das DCNT, acidentes e violências, além das mudanças no padrão de vida, comportamentos e exposições. O Brasil é um país que

envelhece e a carga de doenças crônicas tende a aumentar, exigindo um novo modelo de atenção à saúde para a população (BRASIL, 2015).

As DCVs são a principal causa de morte no País, apesar da mortalidade ter caído ao longo dos anos (cerca de 44% para doenças cardíacas), ela ainda permanece alta. Em 2004, a mortalidade atribuível às DCVs foi de 286 por 100mil habitantes, sendo aquelas que geram maiores custos de internações hospitalares. De acordo com dados do ELSA-Brasil¹, a prevalência de doença coronariana e infarto na população entre 35 e 74 anos foram de 4,7% e 1,7% respectivamente (SCHMIDT, 2015 *apud* BRASIL, 2015).

No Brasil, aproximadamente 734mil pessoas viviam com HIV/aids em 2014, correspondendo a uma prevalência de 0,4%. Entre os indivíduos de 15 a 49 anos, a prevalência é de 0,6%, sendo 0,7% para homens e 0,4% para mulheres. Nos últimos cinco anos, foram registrados em média 39,7mil casos de aids no Brasil. A taxa de detecção de aids no País apresentou estabilização nos últimos dez anos, com média de 20,5 casos para cada 100mil habitantes, sendo a Região Sudeste a única com tendência de queda significativa. A concentração dos casos de aids no Brasil está entre os indivíduos com idade entre 25 a 39 anos para ambos os sexos. Avaliação do coeficiente de mortalidade padronizado demonstra uma tendência significativa de queda nos últimos dez anos, de 6,1 óbitos para cada 100mil habitantes em 2004, para 5,7 em 2013, representando uma queda de 6,6% (BRASIL, 2015).

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o número de casos confirmados de aids no Brasil aumentou gradativamente na década de 90, alcançando a estabilidade nos últimos anos (FIGURA 1). O número de óbitos por aids também se manteve estável na última década (FIGURA 1), demonstrando que o País oferece condições adequadas para o diagnóstico e a assistência, incluindo ações educativas e medidas individuais para a prevenção da doença (IBGE, 2010; IBGE, 2009). O Brasil, juntamente com os países Latino-americanos e do Caribe, estabeleceu metas específicas para continuidade das ações de atenção em HIV/aids. Essas metas foram denominadas “90/90/90” e incluem 90% das pessoas com HIV com conhecimento de sua condição sorológica, 90% das pessoas com HIV recebendo TARV e 90% das pessoas em TARV alcançando supressão viral até 2020. O Ministério da Saúde estruturou o programa de gestão compartilhada para a atenção aos pacientes com HIV/aids na rede de Atenção Básica, incorporando novas apresentações

¹ SCHMIDT, M. I. et al. Cohort profile: longitudinal study of adult health (ELSA-Brasil). *International Journal of Epidemiology*, v.44, n.1, p.68-75, 2015.

terapêuticas e aperfeiçoando sistemas informatizados para o acompanhamento do cuidado contínuo (BRASIL, 2015).

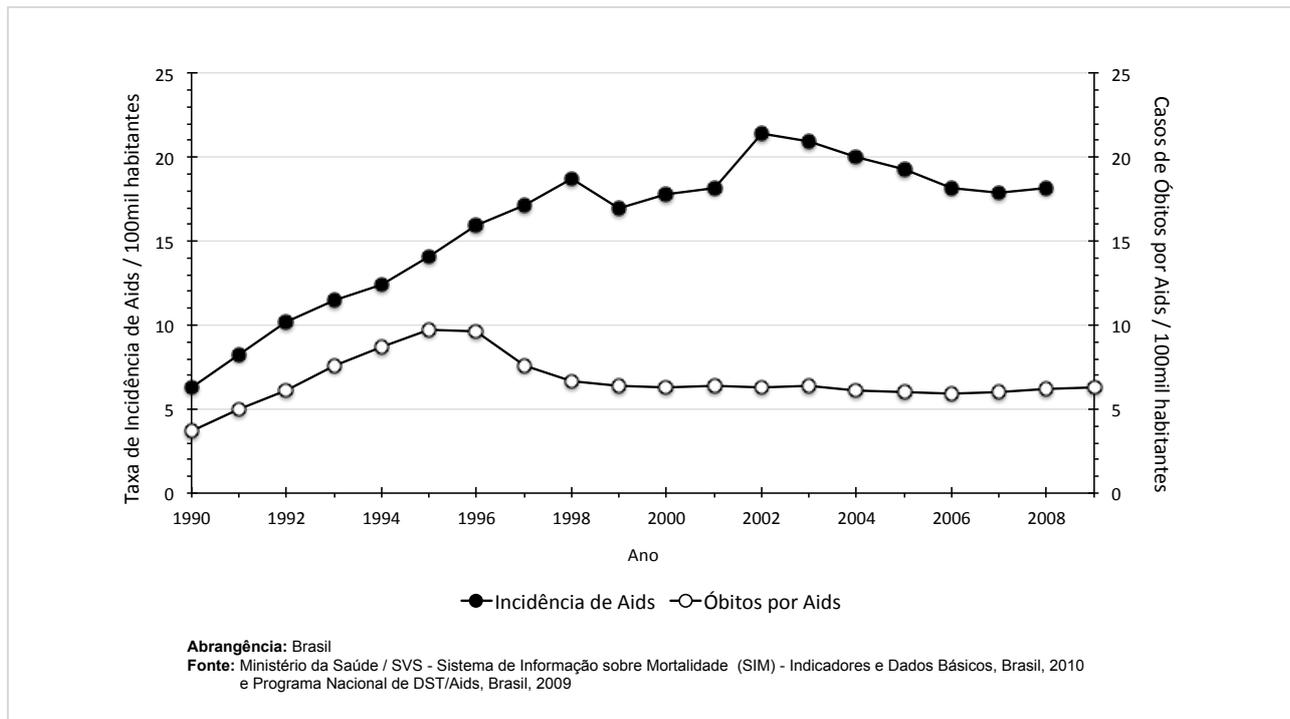


FIGURA 1: Incidência de Aids e Número de Óbitos por Aids no Brasil, no Período de 1990 a 2009. Taxa de incidência da doença (círculo cheio) por 100mil habitantes e casos de óbitos (círculo vazio) por 100mil habitantes. Fonte: IBGE, 2010; IBGE, 2009.

Aids: síndrome da imunodeficiência adquirida; **DST:** doenças sexualmente transmissíveis; **IBGE:** Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

Assim, na era dos antirretrovirais altamente potentes, os indivíduos infectados pelo HIV começaram a apresentar risco maior para o desenvolvimento de DCVs. Estudos discutem que o aumento do risco cardiovascular pode ser associado tanto à infecção viral, quanto ao TARV, que provocam mudanças pró-aterogênicas como aumento de colesterol total e da lipoproteína de baixa densidade (LDL), além da diminuição da lipoproteína de alta densidade (HDL). A ativação imune e as alterações lipídicas são mecanismos conhecidamente associados com a infecção pelo HIV e com o risco de DCV.

Este trabalho utilizou ensaios imunoenzimáticos (ELISA) para a determinação plasmática de biomarcadores emergentes de risco cardiovascular relacionados com modificações lipídicas, ou seja, LDL eletronegativa [LDL(-)] e formas oxidadas da LDL, ou seja, LDL-oxi (resíduos lisina da apolipoproteína B100 - ApoB100 - modificados com malondialdeído), LDL-HNE (resíduos lisina da ApoB100 modificados com 4-hidroxinonenal) e LDL-CML (resíduos lisina da ApoB100 modificados por

carboximetila) e biomarcadores relacionados com a resposta imune-inflamatória, ou seja, autoanticorpos IgG e IgM anti-LDL(-), imunocomplexo de LDL(-) [IC-LDL(-)], proteína amiloide sérica A (SAA) e mieloperoxidase (MPO). Também foram determinadas as concentrações séricas dos biomarcadores de risco relacionados às lipoproteínas: apolipoproteína A-I (ApoA-I), apolipoproteína B (ApoB) e apolipoproteína E (ApoE).

A população estudada incluiu indivíduos com infecção pelo HIV, tratados (HIV-TARV) e não tratados (HIV-NT) com terapia antirretroviral e indivíduos sem infecção pelo HIV (controle).

2.PROCESSO DA ATEROSCLEROSE

Estudos demonstram o papel da inflamação no desenvolvimento da doença arterial coronariana. A resposta inflamatória de células endoteliais desempenha papel chave na patogênese de vários estágios da aterosclerose, incluindo o início e progressão da placa de ateroma, sua instabilidade e rompimento. Várias fontes potenciais podem ser relacionadas com esse processo, incluindo forças hemodinâmicas, estresse oxidativo e lipoproteínas modificadas (ZAKYNTHINOS; PAPPA, 2009).

O elemento chave para o desenvolvimento da placa aterosclerótica consiste na captação de LDL por macrófagos que leva à formação de células espumosas carregadas de lipídios (HSUE; DEEKS; HUNT, 2012; ZAKYNTHINOS; PAPPA, 2009). As partículas lipídicas pró-aterogênicas, que infiltram a íntima arterial, ativam células endoteliais provocando aumento da expressão de moléculas de adesão e inflamatórias, que atraem as células inflamatórias (HSUE; DEEKS; HUNT, 2012). As células mononucleares e placa gordurosa estimulam a liberação de citocinas, como interleucina 1 (IL-1) e interleucina 6 (IL-6), e o recrutamento de outras células inflamatórias, incluindo macrófagos, mastócitos e células T ativadas, gerando nova captação e oxidação de LDL. As citocinas estimulam a proliferação de células musculares lisas e o desenvolvimento da capa fibrosa de colágeno, que cobre o centro necrótico inflamatório da placa. O colágeno produzido pelas células musculares lisas fornece resistência mecânica e estabilidade da capa fibrosa (HSUE; DEEKS; HUNT, 2012; ZAKYNTHINOS; PAPPA, 2009). Entretanto, macrófagos ativados também podem secretar metaloproteinases de matriz (MMPs) que degradam o colágeno, tornando essa capa fibrosa fraca e favorecendo sua ruptura (ZAKYNTHINOS; PAPPA, 2009).

A etapa inicial da aterosclerose é a disfunção endotelial que promove inflamação, estresse oxidativo e agregação plaquetária. As partículas de LDL entram na parede do vaso, tornando-se oxidadas (LDL-oxi – lipoproteína de baixa densidade oxidada), enquanto uma acentuada resposta inflamatória é induzida pela expressão de citocinas pró-inflamatórias. Os monócitos da circulação sanguínea também entram na parede celular, diferenciando-se em macrófagos e acumulando partículas LDL-oxi, favorecendo a formação de células espumosas. Há também um acúmulo extracelular de lipídios modificados na parede vascular, bem como infiltração de neutrófilos e

linfócitos. Esse processo inflamatório resulta no desenvolvimento da placa de ateroma (SIASOS et al., 2015). Alterações no metabolismo lipídico promovem o acúmulo patológico de lipídeos na parede dos vasos, oxidação e inflamação crônica e a formação das lesões ateroscleróticas, culminando nos eventos clínicos (TSIMIKAS; MILLER, 2011).

2.1. PROCESSO DA ATEROSCLEROSE EM PACIENTES HIV POSITIVOS

Com o acesso universal aos cuidados em saúde, a TARV melhorou o prognóstico dos indivíduos infectados pelo HIV, diminuindo a mortalidade relacionada com a aids e aumentando os casos de mortalidade devido a DCV (BELTRÁN et al., 2015; LO, 2011; NOU et al., 2016a). Assim, os cuidados com esses indivíduos passaram do tratamento de doenças relacionadas com a imunodeficiência para o acompanhamento de doenças crônicas como a aterosclerose (NOU et al., 2016a). O amplo acesso aos modernos tratamentos tornou os níveis plasmáticos de RNA (ácido ribonucleico) do HIV indetectáveis pelos testes convencionais e a supressão mediada pelo tratamento resultou na reconstituição da imunidade, menor morbidade e aumento da expectativa de vida. Por razões ainda não identificadas, indivíduos com longo tempo de TARV apresentam maior prevalência de aterosclerose e alterações vasculares, que indivíduos não infectados na mesma faixa etária (HSUE; DEEKS; HUNT, 2012), sendo a dislipidemia altamente prevalente entre pacientes com infecção crônica pelo HIV, conferindo risco aumentado para DCV nestes indivíduos (LO, 2011).

Complicações cardiovasculares, incluindo eventos clínicos e subclínicos, são mais comuns em indivíduos infectados com HIV, do que em indivíduos não infectados da mesma faixa etária (BELTRÁN et al., 2015; BJÖRKBACKA; FREDRIKSON; NILSSON, 2013; HSUE; DEEKS; HUNT, 2012). A taxa de morte súbita por causas ateroscleróticas e/ou arritmia entre indivíduos com HIV é 4,5 vezes maior do que na população geral. Indivíduos com HIV apresentam mais eventos clínicos cardiovasculares, como doença cardíaca coronariana e doença arterial periférica; e mais danos cardiovasculares subclínicos, como aumento da espessura da camada íntima-média, calcificação coronariana, isquemia miocárdica, disfunção endotelial e doença isquêmica (BELTRÁN et al., 2015).

A idade média da população infectada pelo HIV está aumentando, tanto pela efetividade da TARV, como pelo aumento da expectativa de vida destes indivíduos, o que favorece o desenvolvimento de morbidades associadas à idade, como DCV, diabetes *mellitus* tipo 2, hipertensão e doença renal crônica. Também acredita-se que indivíduos com HIV apresentam envelhecimento biológico acelerado, o que contribui ainda mais para o desenvolvimento precoce das morbidades relacionadas à idade, incluindo a osteoporose (BELTRÁN et al., 2015).

Entre os fatores determinantes para DCV em indivíduos com infecção pelo HIV pode-se citar a inflamação e ativação imune persistentes determinadas pelo próprio vírus, as alterações metabólicas e a disfunção endotelial, além daqueles fatores relacionados com o estilo de vida e predisposição pessoal. Também pode-se incluir a influência da TARV que, apesar de algumas drogas antirretrovirais promoverem alterações deletérias, determinam um impacto positivo para a inflamação, ativação imune e disfunção endotelial, que superam os efeitos deletérios (BAKER; DUPREZ, 2010; BELTRÁN et al., 2015). Outro fator que deve ser considerado é a possibilidade de coinfecção com outros vírus, como hepatite C, citomegalovírus e herpes, que também contribuem para essa rede de interações. Estes fatores e suas interações com a DCV estão apresentados esquematicamente na FIGURA 2 (BELTRÁN et al., 2015).

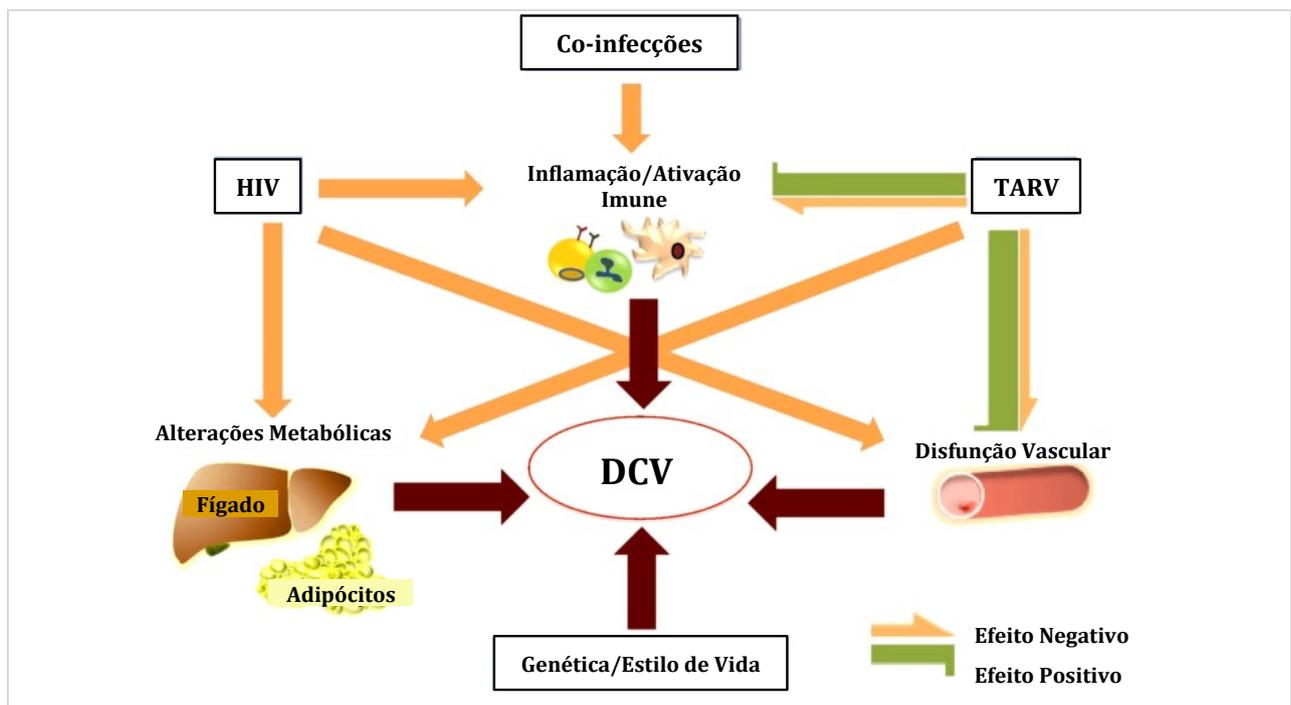


FIGURA 2: Fatores Determinantes de Doença Cardiovascular em Indivíduos com Infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (adaptado de: BELTRÁN et al., 2015).

DCV: doença cardiovascular; HIV: vírus da imunodeficiência humana; TARV: terapia antirretroviral

Assim, o elevado risco cardiovascular observado em indivíduos com HIV pode ser atribuído a alterações metabólicas associadas com a TARV, como os inibidores de protease viral, cuja introdução na prática clínica coincide com os primeiros casos reportados de doença cardíaca isquêmica nestes indivíduos. Entre os efeitos metabólicos deletérios pode-se destacar o desenvolvimento de hipercolesterolemia, a resistência à insulina e o diabetes *mellitus* tipo 2. Estas etiologias foram associadas ao tratamento com inibidores de protease viral, inibidores da transcriptase reversa análogos a nucleosídeos/nucleotídeos e inibidores da transcriptase reversa não análogos a nucleosídeos/nucleotídeos. O início da TARV foi associado com aumento de lipídios plasmáticos, triglicérides e colesterol total com a elevação de LDL e pode ser parcialmente associado com ganho de peso observado após o início do tratamento. Alguns antirretrovirais, principalmente inibidores de protease e inibidores de transcriptase reversa análogos a nucleosídeos/nucleotídeos, foram relacionados com efeitos deletérios na função endotelial e com o aumento de estresse oxidativo e inflamação (BELTRÁN et al., 2015).

O efeito positivo da TARV sobre o risco de DCV foi relacionado com a capacidade do tratamento em reduzir a inflamação, a ativação imune e a disfunção endotelial pela supressão da replicação viral. Assim, o próprio tratamento é um fator importante para a prevenção de DCV em indivíduos com infecção pelo HIV. Entretanto, deve-se salientar que a TARV não reverte completamente as alterações, permanecendo um estado residual de ativação imune, inflamação e ativação endotelial que poderia justificar a frequência aumentada de DCV nestes indivíduos, mesmo na presença de supressão da replicação viral (BELTRÁN et al., 2015).

Os prováveis mecanismos pelos quais a infecção viral pelo HIV pode aumentar o risco cardiovascular estão detalhados na FIGURA 3 e incluem inflamação e ativação imune persistentes, secundárias a translocação microbiana induzida pelo vírus e a baixa endotoxemia; dano endotelial, atividade trombótica, estresse oxidativo aumentados e efeitos indiretos no metabolismo, incluindo efeitos diretos do vírus e de proteínas virais no metabolismo de colesterol de macrófagos; e dislipidemia relacionada com a TARV (BELTRÁN et al., 2015; CROWE et al., 2010). A ativação de vias inflamatórias promove liberação de citocinas e expressão de moléculas de adesão endotelial estreitando a relação entre disfunção endotelial e ativação inflamatória e imune. Esta ativação é acompanhada pelo aumento de marcadores de ativação de monócitos/macrófagos, relacionados com o surgimento e o desenvolvimento da

aterosclerose. A infecção pelo HIV aumenta a proporção de monócitos com fenótipo ativado, aumentando assim a secreção de citocinas pró-inflamatórias (BELTRÁN et al., 2015).

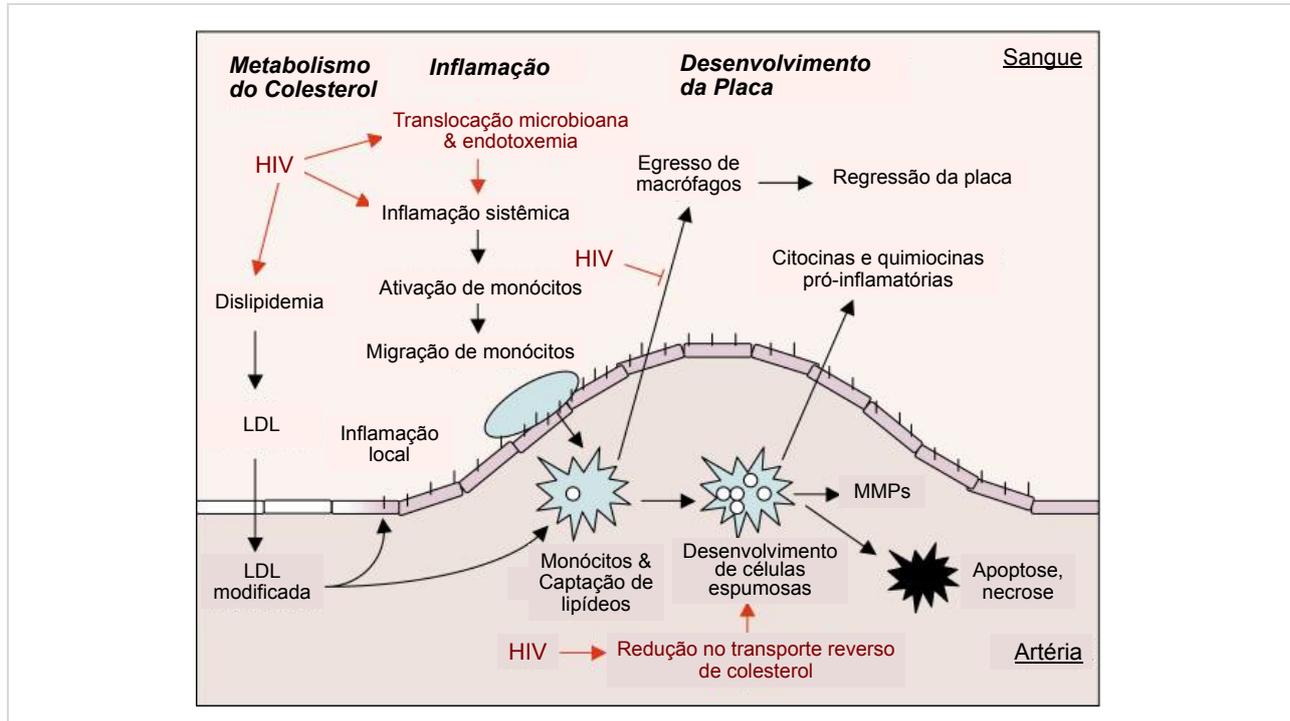


FIGURA 3: Mecanismos Propostos para o Processo da Aterosclerose em Indivíduos com Infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (adaptado de: CROWE et al., 2010).

HIV: vírus da imunodeficiência humana; LDL: lipoproteína de baixa densidade; MMPs: metaloproteinases de matriz

Na FIGURA 3 pode-se destacar dois principais fatores de risco para DCV em indivíduos com infecção pelo HIV: (a) aumento crônico de LDL plasmática e/ou diminuição de HDL; e (b) ativação pró-inflamatória de monócitos e do endotélio vascular, com intensificação da migração dessas células para a lesão aterosclerótica e sua transformação em macrófagos e em células espumosas ricas em lipídeos. Uma regressão na placa aterosclerótica pode ser associada com o egresso de macrófagos do seu interior, ao contrário do acúmulo de células espumosas no local. Em pacientes com hipercolesterolemia, a produção de fatores pró-aterogênicos pode promover apoptose, necrose, expansão e instabilidade da placa, resultando em eventos cardiovasculares. A infecção viral pode afetar cada etapa deste processo, aumentando assim os riscos de DCV tradicionalmente conhecidos (CROWE et al., 2010).

Os monócitos exercem papel importante na aterosclerose e na infecção pelo HIV, pois são os precursores de macrófagos das lesões ateroscleróticas e das células espumosas ricas em lipídeos. A infecção pelo HIV provoca mudanças em

monócitos e macrófagos, que adquirem fenótipo ativado, o que pode gerar impactos no processo aterogênico, apesar da relação entre fenótipo de monócitos e DCV não estar suficientemente caracterizada. Além disso, o vírus interfere com a habilidade dos macrófagos controlarem o excesso de colesterol e a inibição do transporte reverso de colesterol, que são mecanismos que podem impactar no início e progressão das placas ateroscleróticas (CROWE et al., 2010). Assim, a infecção pelo HIV pode acelerar o processo aterosclerótico, não só pela ativação de monócitos/macrófagos, mas também pela alteração funcional destas células (NOU et al., 2016a).

A FIGURA 3 também esquematiza os fatores envolvidos no processo de aterosclerose relacionados com a presença de dislipidemia devido às drogas antirretrovirais, como inibidores de proteínases, associados com aumento de LDL e triglicérides plasmáticos e diminuição de HDL. A própria infecção pelo HIV contribui para a dislipidemia pelos efeitos no metabolismo do colesterol. O vírus também tem efeito sobre o egresso de macrófagos da placa aterosclerótica e o acúmulo de células espumosas. Estudos *in vitro* demonstram que o egresso de macrófagos por migração pelo endotélio vascular está comprometido em macrófagos de indivíduos infectados pelo HIV. O acúmulo de células espumosas resultante da internalização de lipoproteínas também sofre influência da redução na capacidade migratória. A infecção viral também afeta o transporte reverso de colesterol, o que favorece também o acúmulo de células espumosas na placa. As células espumosas também produzem fatores pró-aterogênicos como quimiocinas, citocinas e MMPs, que favorecem a expansão da placa de ateroma e sua instabilidade que podem ocasionar o surgimento de apoptose e/ou necrose em ambiente de hipercolesterolemia (CROWE et al., 2010).

Portanto, tanto os efeitos metabólicos da infecção pelo HIV, quanto a exposição à TARV, favorecem o processo de aterogênese pela diminuição de HDL e apolipoproteína A-I (ApoA-I) e pelo aumento de colesterol, triglicérides e LDL, incluindo a associação com a alta prevalência de partículas pequenas e densas pró-aterogênicas de LDL (BAKER; DUPREZ, 2010; BELTRÁN et al., 2015; LO, 2011). Várias vias enzimáticas, assim como a replicação viral podem ser relacionadas com aumento do risco para DCV, por efeito parcialmente mediado pelo processo inflamatório crônico e por efeitos no metabolismo lipídico (HSUE; DEEKS; HUNT, 2012).

Tanto a ativação imune, como as alterações lipídicas são mecanismos associados com a infecção pelo HIV e com o risco de DCV. Assim, a infecção pelo HIV provoca alterações no perfil lipídico, bem como a TARV apresenta efeitos complexos

nas concentrações destes lipídios, gerando agentes pró-inflamatórios e potencialmente prejudiciais que persistem durante a infecção não tratada e tratada (HSUE; DEEKS; HUNT, 2012).

Estudos indicam que vários biomarcadores plasmáticos inflamatórios, usados para predizer eventos cardiovasculares na população em geral, estão elevados em indivíduos HIV positivos tratados, podendo também predizer eventos cardiovasculares (HSUE; DEEKS; HUNT, 2012). Vários biomarcadores de inflamação, de ativação imune e de disfunção endotelial, associados com DCV na população em geral, têm sido estudados em pacientes HIV, apresentando-se aumentados nestes indivíduos (BELTRÁN et al., 2015).

3. BIOMARCADORES DE RISCO CARDIOVASCULAR

Biomarcadores de risco cardiovascular tradicionais foram definidos na V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose (XAVIER et al., 2013) e em diretrizes internacionais, sendo recomendados para o acompanhamento e avaliação de risco para DCVs.

Para o presente estudo, avaliou-se os biomarcadores emergentes e não tradicionais que podem ser utilizados para complementar a avaliação de risco cardiovascular (TABELA 1) na população geral, bem como em indivíduos com a infecção pelo HIV. A aplicação dos biomarcadores emergentes tem sido discutida em várias situações clínicas, sendo esses parâmetros relacionados com as modificações lipídicas das partículas de LDL, com resposta imune-inflamatória e com estresse oxidativo. Para os biomarcadores não tradicionais, a literatura possui resultados discutidos, mas ainda não foram incluídos nos escores de avaliação de pacientes com risco de DCV (XAVIER et al., 2013).

TABELA 1: Biomarcadores Tradicionais, Não Tradicionais e Emergentes Relacionados com a Avaliação de Risco Cardiovascular.

Tradicional	Não Tradicional*	Emergente**
Colesterol total	Apolipoproteína A-I	LDL eletronegativa
Triglicérides	Apolipoproteína B	Anticorpos IgG anti-LDL eletronegativa
LDL-colesterol	Apolipoproteína E	Anticorpos IgM anti-LDL eletronegativa
HDL-colesterol		Imunocomplexos de LDL eletronegativa
Proteína C reativa		LDL oxidada ^a
		LDL-HNE ^b
		LDL-CML ^c
		Proteína amiloide sérica A
		Mieloperoxidase

Fonte: V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. Adaptado de: XAVIER et al., 2013.

* Biomarcadores de composição proteica de lipoproteínas; ** Biomarcadores de modificação lipídica, de resposta imune-inflamatória e estresse oxidativo

^a LDL oxidada com resíduos de lisina da apolipoproteína B100 modificados com malondialdeído (MDA); ^b LDL oxidada com resíduos de lisina da apolipoproteína B100 modificados com 4-hidroxinonenal; ^c LDL oxidada com resíduos de lisina da apolipoproteína B100 modificados por carboximetila

CML: carboximetila; **HDL:** lipoproteína de alta densidade; **HNE:** 4-hidroxinonenal; **IgG:** imunoglobulina G; **IgM:** imunoglobulina M; **LDL:** lipoproteína de baixa densidade

3.1. BIOMARCADORES DE MODIFICAÇÃO LIPÍDICA

3.1.1. LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE ELETRONEGATIVA [LDL(-)]

A LDL e seus produtos oxidados possuem importante papel na formação da placa aterosclerótica. Essa lipoproteína compreende um espectro heterogêneo de partículas, classificadas de acordo com sua densidade, composição química e propriedades físicas. As partículas pequenas e densas de LDL têm sido consideradas altamente aterogênicas e associadas com DCV e com risco de eventos cardiovasculares. A alteração química mais frequente da LDL é a oxidação que leva à formação da LDL-oxi, encontrada em placas coronarianas e na circulação sanguínea (NICCOLI et al., 2012), cujas concentrações variam de 0,01 a 0,5% da LDL total. Hipóteses para modificação lipídica sugerem que a oxidação é o evento inicial da aterosclerose e as variantes da LDL, como LDL-oxi e LDL pequena e densa estariam associadas com a promoção da aterogênese e com as DCVs (BRUNELLI et al., 2014; KE et al., 2014).

Outra forma de LDL minimamente oxidada que tem ganhado reconhecimento pelo seu papel aterogênico e relação com o desenvolvimento da aterosclerose é a LDL eletronegativa [LDL(-)]. Há mais de duas décadas o termo LDL(-) tem sido usado para descrever uma LDL com mobilidade eletroforética relativamente aumentada em eletroforese em gel de agarose (KE et al., 2014; MELLO et al., 2011). Avogaro, Cazzolato e Bittolo-Bon (1991) foram os pioneiros na identificação desta pequena partícula, com maior carga eletronegativa em amostras de plasma humano, bem como na discussão sobre sua possível formação *in vivo*, pela modificação por processo peroxidativo, e de suas prováveis propriedades aterogênicas (AVOGARO; CAZZOLATO; BITTOLO-BON, 1991). Atualmente, utilizando-se a técnica de FPLC (cromatografia líquida rápida de proteínas) com colunas de troca-iônica, a LDL plasmática pode ser dividida em 5 frações cujas cargas negativas aumentam sequencialmente, sendo designadas de L1 a L5. Essa técnica tem sido considerada método padrão para o isolamento de LDL(-) (KE et al., 2014). Nos últimos anos, as propriedades físicas da LDL foram estudadas, sendo a LDL(-) reconhecida como uma nova classe de LDL, cuja proporção aumentada também foi observada em pacientes com risco cardiovascular (NICCOLI et al., 2012), sendo uma partícula diferente em

tamanho e densidade, na composição lipídica e proteica, com atividade de fosfolipase e com uma conformação diferente para a ApoB100 (ESTRUCH et al., 2015).

Semelhantemente à LDL-oxi, a LDL(-) pode ser internalizada pelas células endoteliais, provocando resposta aterogênica, morte celular por apoptose, citotoxicidade e inflamação (ESTRUCH et al., 2015; STANCEL et al., 2016). Diferentemente da LDL-oxi, a fração L5 ocorre naturalmente sendo uma LDL minimamente oxidada. Esta LDL altamente eletronegativa tem sido chamada de fração L5 (ou simplesmente L5) porque corresponde à quinta subfração mais eletronegativa da LDL. Ambas, LDL-oxi e a fração L5 têm sido identificadas como potenciais biomarcadores de DCV. Concentrações plasmáticas aumentadas de L5 foram identificadas em pacientes com risco cardiovascular, como fumantes, pacientes com diabetes *mellitus* e pacientes com hipercolesterolemia. A porcentagem da fração L5 em relação a LDL total (L5%) foi relacionada com fatores de risco clássicos para DCV, sendo consideradas partículas aterogênicas que induzem inflamação e contribuem para a patogênese da doença arterial coronariana (STANCEL et al., 2016).

A LDL(-) é uma forma naturalmente modificada da LDL, com características relacionadas ao processo de oxidação e outros tipos de modificação, presente na circulação sanguínea em indivíduos saudáveis, representando 2 a 10% da LDL total. Em indivíduos com risco cardiovascular aumentado pode alcançar concentrações superiores a 10% da LDL total. Estudos reportaram correlação entre níveis aumentados de LDL(-) e marcadores de risco cardiovascular, assim como com a gravidade da doença arterial coronariana. Outros estudos demonstraram a contribuição da LDL(-) na aterogênese, por meio de diferentes mecanismos que podem incluir atividades pró-inflamatórias e pró-apoptóticas (BRUNELLI et al., 2014; MELLO et al., 2011). A LDL(-) está aumentada em casos de hipercolesterolemia familiar, hipertrigliceridemia, esteatohepatite não alcoólica, diabetes *mellitus* e doença arterial coronariana, bem como em pacientes submetidos à hemodiálise e atletas após exercício aeróbico (MELLO et al., 2011). A LDL(-) promove citotoxicidade, apoptose e inflamação (ESTRUCH et al., 2015).

Várias modificações aterogênicas das partículas de LDL no plasma sanguíneo humano têm sido descritas. A FIGURA 4 apresenta esquematicamente as modificações aterogênicas ocorridas na LDL e sua transformação em LDL(-). Essas alterações incluem a perda de colesterol livre e colesterol ésteres, de fosfolípidos e triglicerídeos, aumento da densidade da partícula e diminuição do seu tamanho,

aumento de carga negativa, levando a formação da fração eletronegativa, na qual modificações da ApoB foram reportadas. Nos estágios finais, observa-se aumento da oxidação, diminuição do conteúdo antioxidante e a formação de complexos altamente aterogênicos, devido à autoagregação das partículas modificadas de LDL e à formação de autoanticorpos (IVANOVA; BOBRY SHEV; OREKHOV, 2015). Assim, a subfração LDL(-) constitui-se de uma mistura heterogênea de partículas de LDL, com carga negativa aumentada por vários mecanismos (SÁNCHEZ-QUESADA; VILLEGAS; ORDÓÑEZ-LLANOS, 2012).

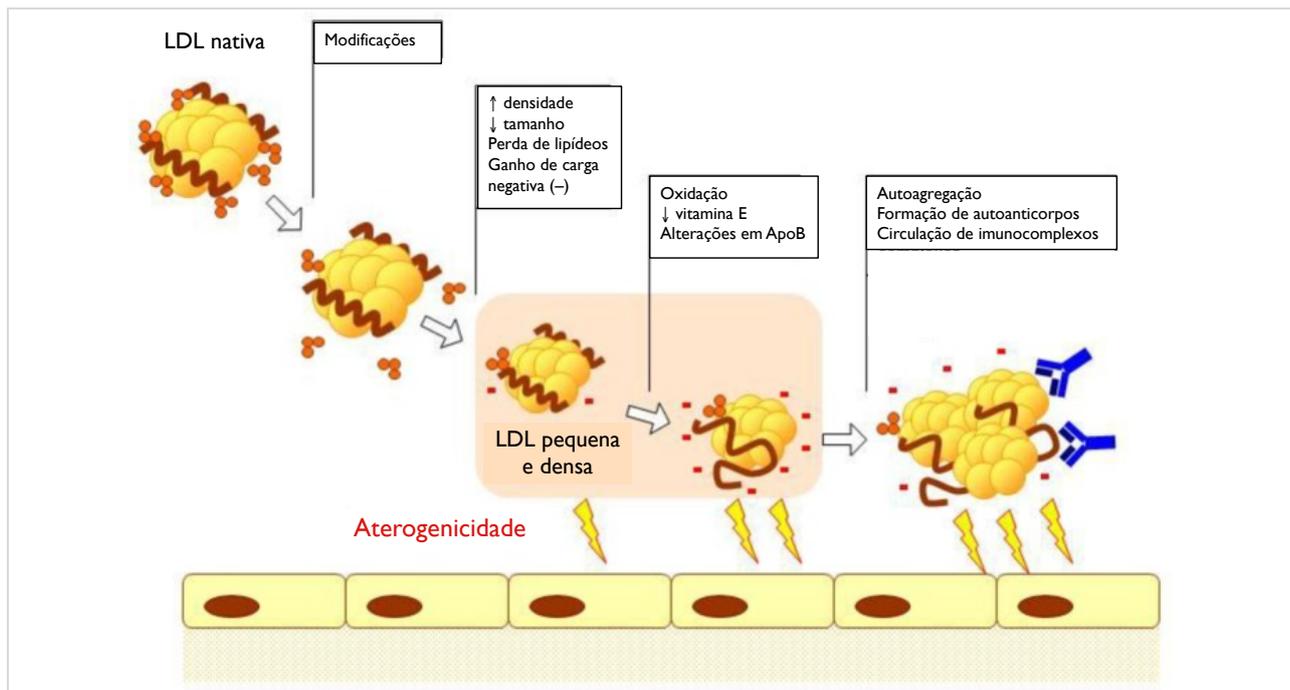


FIGURA 4: Modificações Aterogênicas da Lipoproteína de Baixa Densidade e a Formação da Lipoproteína de Baixa Densidade Eletronegativa (adaptado de: IVANOVA; BOBRY SHEV; OREKHOV, 2015).

ApoB: apolipoproteína B; **LDL:** lipoproteína de baixa densidade

As propriedades aterogênicas mais estudadas da LDL(-) são suas atividades pró-inflamatória e apoptótica em cultura de células endoteliais, linfócitos, monócitos e macrófagos. Estudos indicam que essas partículas agregam-se espontaneamente, favorecendo a agregação de LDL nativa, e também sugerem que essa sub-fração tem papel relevante na aterogênese pela atuação como fator estimulador da agregação de lipoproteínas. A LDL(-) pode ser gerada no plasma por mecanismos que incluem lipoperoxidação, glicação, carbamilação, lipólise ou proteólise, de acordo com fatores individuais e da doença de base, adquirindo

propriedades aterogênicas que desencadeiam resposta inflamatória localizada, promovem o recrutamento de leucócitos e o desenvolvimento dos eventos relacionados com a aterosclerose. Também pode ser formada no espaço subendotelial e liberada de proteoglicanos por processo de oxidação mediado por mieloperoxidase (MPO), o que possibilita seu retorno ao sangue (SÁNCHEZ-QUESADA; VILLEGAS; ORDÓÑEZ-LLANOS, 2012). A interação de LDL(-) com células endoteliais promove a liberação de citocinas e contribui para aumento da formação de células espumosas, ampliando o estresse oxidativo na íntima e modificando a composição da matriz extracelular do ateroma (MELLO et al., 2011). A LDL(-) induz a liberação de mediadores inflamatórios pelas células endoteliais e leucócitos. Entretanto, os mecanismos pelo quais a resposta inflamatória é ativada pela LDL(-) ainda não foram totalmente definidos (ESTRUCH et al., 2015).

Os mecanismos pró-aterogênicos da LDL(-) podem ser múltiplos. A LDL(-) também tem sido considerada citotóxica, por ser mais densa e mais suscetível a oxidação que a LDL nativa, por promover a liberação de fatores pró-inflamatórios e aterogênicos em células endoteliais e induzir o recrutamento de leucócitos, sugerindo um novo papel para a LDL(-) na aterogênese (MELLO et al., 2011; NICCOLI et al., 2012).

3.1.2. FORMAS OXIDADAS DE LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE

Na oxidação da LDL, os ácidos graxos insaturados são decompostos a malondialdeído (MDA) e 4-hidroxinonenal (HNE), dentre outros produtos. Estes compostos podem reagir com os resíduos de lisina da apolipoproteína B100 (ApoB100), neutralizando-os e interferindo na capacidade de ligação com glicosaminoglicanos da matriz extracelular arterial. Assim, os vários modelos de oxidação podem produzir partículas de LDL incapazes de se ligarem a essas estruturas (PENTIKÄINEN; ÖÖRNI; KOVANEN, 2001).

O processo de oxidação das lipoproteínas, em particular da LDL, pode ser considerado como mediador de várias vias pró-aterogênicas e pró-inflamatórias. Vários mecanismos *in vivo* foram descritos para a oxidação da LDL, envolvendo a participação de metais, como cátions bivalentes, heme, diferentes sistemas enzimáticos, como

lipoxigenases, MPO, NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato na forma reduzida) oxidases e óxido nítrico sintases (TSIMIKAS; MILLER, 2011).

As modificações oxidativas das lipoproteínas, especialmente da LDL, estão reconhecidamente associadas à aterosclerose, sendo que vários estudos detectaram partículas de LDL oxidadas em humanos. A LDL-oxi resulta da exposição da LDL a um número de agentes oxidantes, como ânion superóxido e peróxido de hidrogênio presentes em células, especialmente macrófagos da parede arterial; enzimas, como lipoxigenase e produtos da MPO. Essa exposição causa a depleção de compostos antioxidantes e posterior oxidação de componentes lipídicos e proteicos das partículas de LDL (MELLO et al., 2011).

Indivíduos com infecção pelo HIV apresentam concentrações aumentadas de LDL-oxi, relacionada com doença vascular e aterosclerose, por sua atividade pró-inflamatória e pelo desenvolvimento de células espumosas, representando a ligação entre lipídeos, inflamação e aterosclerose. Também contribuem para a proliferação de células musculares lisas e para a ativação de células endoteliais das artérias, etapas importantes na formação da placa aterosclerótica (HILEMAN et al., 2016; NOU et al., 2016b; ZIDAR et al., 2015). Mudanças na concentração de LDL-oxi foram relacionadas com alterações no volume de placas não calcificadas, independentemente da concentração de LDL, em indivíduos com infecção pelo HIV, que também foram tratados com estatinas (NOU et al., 2016b). Também foram identificadas correlações entre as concentrações plasmáticas de LDL-oxi e a espessura média-intima das carótidas em indivíduos com infecção pelo HIV. As concentrações alteradas de lipídeos pró-inflamatórios, como a LDL-oxi, em indivíduos com infecção pelo HIV foram relacionadas com a ativação de monócitos *in vitro* (ZIDAR et al., 2015).

O papel da inflamação na aterosclerose e na fragilidade da placa aterosclerótica está bem reconhecido, entretanto, somente nos últimos anos tem se tornado evidente que a inflamação é modulada pela resposta imune contra antígenos da placa como a LDL-oxi. Curiosamente, ambas as respostas imunes protetora e patogênica existem e dados experimentais sugerem que a modulação destas respostas imunes representam um alvo promissor para o tratamento da doença cardiovascular (BJÖRKBACKA; FREDRIKSON; NILSSON, 2013).

3.2. BIOMARCADORES DE RESPOSTA IMUNE-INFLAMATÓRIA E ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo tem sido relacionado com o desenvolvimento das lesões ateroscleróticas, pois alguns biomarcadores foram relacionados com o risco para eventos cardiovasculares (HILEMAN et al., 2016). Tanto a cascata inflamatória como a ativação celular do sistema imune contribuem para a progressão da aterosclerose e podem ser usados como indicadores prognósticos adicionais em pacientes com doença aterosclerótica estável ou instável (SIASOS et al., 2015).

A inflamação é considerada uma importante etapa na progressão da aterosclerose e envolve várias células, mediadores e sinalizações celulares. Assim, um biomarcador capaz de determinar o estágio de inflamação vascular é necessário, uma vez que a combinação de biomarcadores inflamatórios com fatores de risco clássicos poderão prover futuras informações sobre a progressão da aterosclerose e do risco cardiovascular (SIASOS et al., 2015). Estudos indicam que várias proteínas associadas a lipoproteínas, cujas concentrações se alteram durante a inflamação aguda e crônica, poderiam servir como marcadores de doença cardiovascular (CHAIT et al., 2005).

3.2.1. ANTICORPOS ANTI-LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE ELETRONEGATIVA [ANTI-LDL(-)]

A LDL(-) apresenta propriedades pró-inflamatórias e imunogênicas. A LDL(-), assim como a LDL-oxi, é capaz de ativar as respostas inflamatória e imune, mas o real impacto dos autoanticorpos anti-LDL(-) no processo aterosclerótico e outras doenças crônicas ainda não foi esclarecido. A concentração de anticorpos anti-LDL(-) em pacientes com angina instável e estável foi maior que em indivíduos saudáveis, reforçando a ideia do potencial efeito negativo desses anticorpos (MELLO et al., 2011).

A FIGURA 5 apresenta os mecanismos propostos para a interação entre LDL(-) e o processo de aterogênese, incluindo a formação de autoanticorpos e imunocomplexos. As modificações da LDL nativa podem ocorrer no plasma sanguíneo ou durante sua migração para o espaço subendotelial, onde a partícula sofre oxidação e mudanças estruturais resultando na produção de LDL(-). A formação de LDL(-) inclui além das modificações oxidativas, modificações físicas e biológicas como sua glicação

não enzimática, aumento na atividade enzimática devido às enzimas associadas à superfície destas partículas (ex.: PAF-acetil hidrolase e fosfolipase A2), enriquecimento do conteúdo de ácidos graxos não esterificados (NEFA), hemoglobina, além do aumento no conteúdo de ApoCIII (apolipoproteína CIII) e ApoE (apolipoproteína E) na LDL. A interação de LDL(-) com as células endoteliais promove a liberação de citocinas e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que contribuem para aumentar sua oxidação e posterior internalização por macrófagos com a formação de células espumosas que amplificam o estresse oxidativo na camada íntima arterial. Os epítomos da LDL(-) são apresentados às células B, estimulando-se a produção de anticorpos anti-LDL(-). Após esta etapa, IC-LDL(-) formados podem precipitar e estimular a manutenção das respostas imune e inflamatórias. Assim, a LDL(-), seus anticorpos e imunocomplexos podem alcançar a circulação e serem detectados como biomarcadores do processo de formação das lesões ateroscleróticas (MELLO et al., 2011).

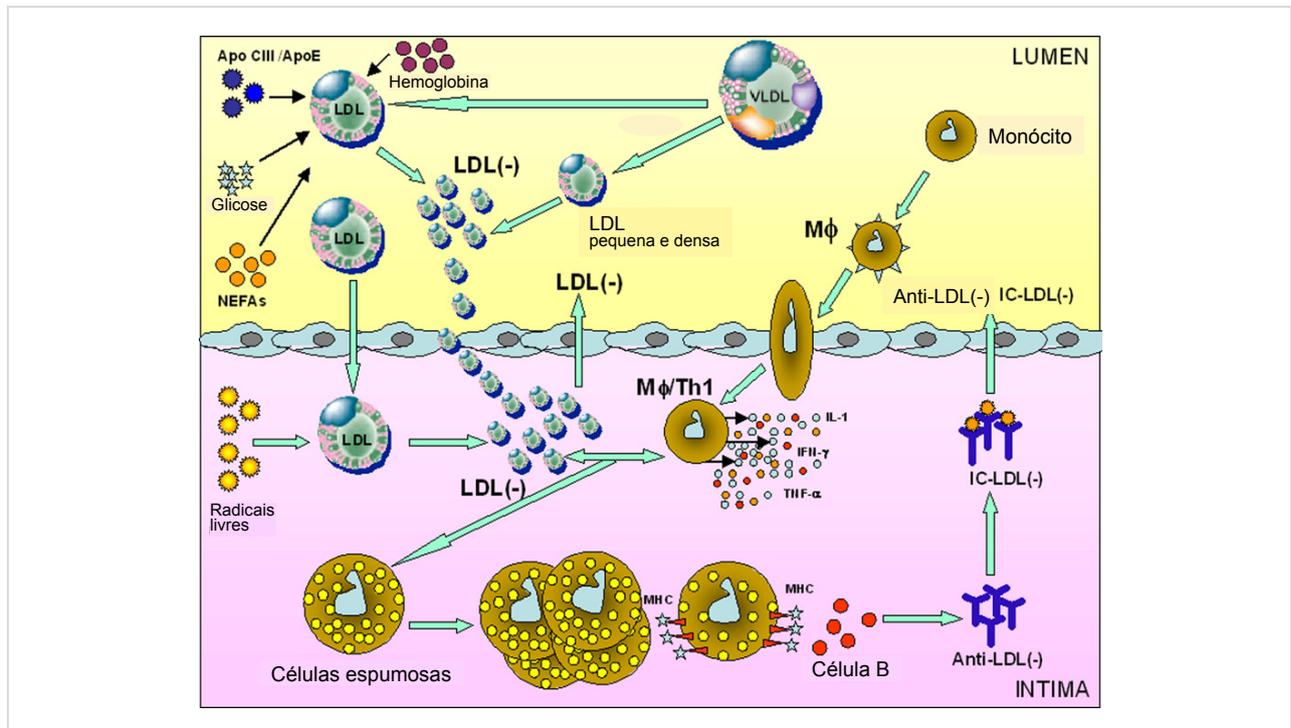


FIGURA 5: Mecanismos Propostos para o Processo de Produção de Autoanticorpos e Imunocomplexos de Lipoproteína de Baixa Densidade Eletronegativa na Aterogênese (adaptado de: MELLO et al., 2011).

Anti-LDL(-): autoanticorpos anti-lipoproteína de baixa de densidade eletronegativa; **ApoCIII:** apolipoproteína CIII; **ApoE:** apolipoproteína E; **IC-LDL(-):** imunocomplexos de lipoproteína de baixa densidade eletronegativa; **IL-1:** interleucina 1; **INF-γ:** interferon gama; **LDL:** lipoproteína de baixa densidade; **LDL(-):** lipoproteína de baixa densidade eletronegativa; **MHC:** complexo principal de histocompatibilidade; **MΦ:** macrófagos; **MΦ/Th1:** macrófagos ativado por células T citotóxicas (Th1); **NEFAs:** ácidos graxos não esterificados; **TNFα:** fator de necrose tumoral alfa; **VLDL(-):** lipoproteína de muito baixa densidade

Ainda não foi esclarecido o papel dos anticorpos contra vários epítomos de lipoproteínas modificadas, se estes possuem características pró-aterogênicas ou anti-aterogênicas. Estudos apresentaram controvérsias sobre as funções de anticorpos das classes IgG e IgM, que parecem refletir processos fisiopatológicos distintos. Em geral, evidências sugerem que anticorpos IgG contra LDL-oxi podem ser associados com as propriedades pró-aterogênicas. Os anticorpos IgG anti-LDL(-) também foram correlacionados com o grau de aterosclerose e sua progressão, demonstrando que indivíduos com síndrome coronariana aguda têm níveis mais elevados destes anticorpos, quando comparados com indivíduos com síndrome coronariana crônica ou saudáveis, sugerindo que tais anticorpos possam ser usados como indicativos não somente de síndrome coronariana, mas também de instabilidade da placa aterosclerótica (OLIVEIRA et al., 2006).

Verifica-se uma crescente necessidade de estudos para a identificação e a validação de biomarcadores imunológicos relacionados com a caracterização do risco cardiovascular, bem como no desenvolvimento de biomarcadores relacionados com o monitoramento do efeito de vacinas para aterosclerose em estudos clínicos. Alguns dos marcadores propostos incluem autoanticorpos antígeno-específicos contra a placa, anticorpos contra antígenos da vacina e anticorpos que caracterizam células circulantes do sistema imune envolvidas com o processo da doença. Para se garantir sensibilidade adequada, esses biomarcadores baseados em autoanticorpos também precisam ser antígeno-específicos (BJÖRKBACKA; FREDRIKSON; NILSSON, 2013).

A LDL-oxi também é alvo de autoanticorpos IgG, cujo papel no desenvolvimento da aterosclerose ainda não está esclarecido, assim como sua associação com a gravidade da aterosclerose e com o risco cardiovascular precisam de comprovação por estudos clínicos. A dificuldade reside na falta de padronização para o antígeno de LDL oxidada que deve ser usado na produção de anticorpos para os ensaios imunoenzimáticos, apesar de estudos baseados em antígenos peptídicos da apolipoproteína B100 (ApoB100) terem demonstrado resultados consistentes. Concentrações aumentadas de autoanticorpos IgG contra peptídeos da ApoB têm sido geralmente associados com casos menos graves de aterosclerose e com baixo risco cardiovascular (BJÖRKBACKA; FREDRIKSON; NILSSON, 2013).

3.2.2. IMUNOCOMPLEXOS DE LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE ELETRONEGATIVA [IC-LDL(-)]

As lipoproteínas modificadas contribuem para o desenvolvimento da aterosclerose por diversos mecanismos, incluindo sua capacidade de desencadear a resposta imune com produção de autoanticorpos e subsequentemente a formação de imunocomplexos. O envolvimento de imunocomplexos de LDL (IC-LDL) na patogênese da aterosclerose foi sugerido em estudos que demonstraram a presença de LDL-oxi e seus correspondentes anticorpos IgG em lesões ateromatosas de humanos e coelhos. A incubação de macrófagos com IC-LDL, preparado com LDL humana e anticorpos anti-LDL de coelho, induzem a formação de células espumosas *in vitro* mais eficientemente que qualquer outro mecanismo (MIRONOVA et al., 2000).

Alguns trabalhos demonstraram correlação positiva entre as concentrações de LDL-oxi e IC-LDL, ambos aumentados em pacientes com doença cardíaca coronariana (BING et al., 2004). Também foi demonstrado que concentrações aumentadas de IC-LDL modificada podem ser associados com a progressão da espessura das camadas íntima e média da carótida em pacientes com diabetes tipo I, favorecendo formação ou deposição de imunocomplexos com lipoproteínas modificadas na parede vascular (LOPES-VIRELLA et al., 2007).

3.2.3. PROTEÍNA AMILÓIDE SÉRICA A (SAA)

A amiloide sérica A (SAA) é uma apolipoproteína transportada na circulação primariamente em associação com HDL (CHAIT et al., 2005), deslocando a apolipoproteína A-I (ApoA-I) desta partícula (UHLAR; WHITEHEAD, 1999). SAA associada à lipoproteína pode ter papel no transporte de colesterol, aumentando a entrega deste para células periféricas. Na circulação, a SAA livre pode associar-se à HDL na parede arterial ou ser secretada pelas próprias células da parede arterial. Portanto, SAA associada ou não associada a lipoproteínas poderá apresentar diferentes papéis para o transporte de colesterol para as células em sítios inflamatórios ou de lesões (CHAIT et al., 2005).

Como a proteína C reativa (PCR), a SAA também aumenta sua concentração rapidamente em inflamações agudas (CHAIT et al., 2005), por ser uma

proteína de fase aguda. A SAA liga-se às partículas de HDL, promovendo diminuição dos níveis de HDL durante a resposta de fase aguda. Também está relacionada com a produção de pequenas partículas de HDL, que são posteriormente degradadas (SIASOS et al., 2015).

Estudos indicam que a concentração sérica de SAA, após o evento de infarto do miocárdio, pode auxiliar na predição de risco de novos eventos cardiovasculares (ZAKYNTHINOS; PAPPA, 2009). Concentrações aumentadas de SAA foram relacionadas com o risco de doença arterial coronariana em humanos. Estudos em animais demonstraram o papel desta proteína na aterogênese, uma vez que RNA mensageiro foi detectado na maioria dos tipos celulares presentes em lesões ateroscleróticas. Concentrações aumentadas de SAA também foram associadas com condições relacionadas com o aumento do risco cardiovascular como obesidade, resistência à insulina, síndrome metabólica, diabetes e artrite reumatoide (CHAIT et al., 2005). Modelos de animais hiperlipidêmicos sugerem o papel mediador da SAA na aterosclerose e bem como de marcador para DCV. Foram encontradas concentrações aumentadas de PCR e SAA em indivíduos com síndrome metabólica (CHAIT et al., 2005). Considerada como novo biomarcador de inflamação, associado com a progressão da aterosclerose, a SAA pode também funcionar como marcador do metabolismo lipídico, pois foi associada com eventos cardiovasculares, após 30 dias, em pacientes com síndromes coronarianas agudas (SIASOS et al., 2015).

3.2.4. MIELOPEROXIDASE

A mieloperoxidase (MPO) é uma heme-proteína produzida por neutrófilos ativados, monócitos e macrófagos teciduais, envolvida com a modificação de LDL, evento crítico no processo de aterogênese. Estudos sugerem a associação entre as concentrações de MPO e doença arterial coronariana, indicando que a MPO poderia ser usada na estratificação do risco (ZAKYNTHINOS; PAPPA, 2009). Também foi demonstrada a relação de MPO no processo de oxidação de HDL em pacientes com aterosclerose (CHAIT et al., 2005). Considerada como novo biomarcador de inflamação associado com a progressão da aterosclerose, a MPO pode atuar como marcador de ativação leucocitária, relacionado com infarto do miocárdio e com o prognóstico de mortalidade hospitalar para pacientes com alterações cardiovasculares (SIASOS et al.,

2015). Estudos demonstraram aumento nas concentrações de MPO em indivíduos com doença arterial coronariana (SIASOS et al., 2015).

A MPO promove o estresse oxidativo, sendo responsável pela peroxidação lipídica, nitração e pela instabilidade da placa aterosclerótica por ativar enzimas de matriz, como as MMPs. A MPO também está presente em neutrófilos, monócitos e macrófagos teciduais, podendo ser usada para identificar pacientes com alto risco, cujos níveis plasmáticos de troponina estavam negativos (SIASOS et al., 2015).

Uma vez que lesões ateroscleróticas humanas demonstraram a presença MPO e lipoproteínas modificadas por hipoclorito, estudos sugerem que a MPO secretada por monócitos/macrófagos na íntima arterial poderia oxidar e extrair LDL da matriz extracelular, com subsequente captação de LDL oxidada pelos macrófagos e, então, levando a formação das células espumosas (PENTIKÄINEN; ÖÖRNI; KOVANEN, 2001). Na íntima arterial, as partículas de LDL oxidadas podem ser modificadas por lipoxigenase, peroxinitrito, radicais de oxigênio e ácido hipoclorito/hipocloroso. Estudos sugerem que a MPO poderia atuar como provável fonte de ácido hipoclorito/hipocloroso, pois é secretada por macrófagos ativados. Além disso, foi demonstrado que lesões ateroscleróticas humanas possuem MPO com atividade catalítica (PENTIKÄINEN; ÖÖRNI; KOVANEN, 2001).

Pentikäinen, Öörni e Kovanen (2001) demonstraram que a LDL liberada de heparina por ação de MPO apresentou-se mais eletronegativa e com menos resíduos não modificados de lisina, do que a LDL que permaneceu ligada à heparina. Este estudo demonstrou que o ácido hipoclorito/hipocloroso produzido pela MPO pode liberar LDL da ligação com heparina. Portanto, os macrófagos da íntima secretariam MPO, que atuariam na ligação de LDL à matriz extracelular (PENTIKÄINEN; ÖÖRNI; KOVANEN, 2001).

A indução de estresse oxidativo promove modificações na LDL, produção de moléculas de adesão e liberação de citocinas pró-inflamatórias que estão envolvidas na formação da placa aterosclerótica. Assim, a inflamação tem papel decisivo na progressão da aterosclerose e estudos têm pesquisado um biomarcador que reflita essa condição inflamatória do microambiente vascular. O biomarcador ideal deveria apresentar características como ser altamente sensível e específico e ser facilmente detectado com baixo custo, além de apresentar estabilidade e confiabilidade. A combinação de biomarcadores inflamatórios com os fatores de risco clássicos

poderiam prover mais informações sobre a progressão da aterosclerose e sobre o risco cardiovascular. Alguns biomarcadores inflamatórios que participam na iniciação ou progressão da aterosclerose têm sido estudados nos últimos anos, como a CRP, a MPO e a SAA (SIASOS et al., 2015).

3.3. BIOMARCADORES DE COMPOSIÇÃO PROTEICA DE LIPOPROTEÍNAS

3.3.1. APOLIPOPROTEÍNA A-I (ApoA-I)

Embora a apolipoproteína A-I (ApoA-I), principal proteína da HDL, não seja amplamente considerada como uma molécula inflamatória, os níveis de ApoA-I claramente diminuem durante a resposta inflamatória aguda em coelhos, camundongos e humanos (CHAIT et al., 2005). Estudos sugerem que a HDL também tem propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes potentes, embora seus mecanismos ainda não sejam completamente compreendidos (CHAIT et al., 2005; DOMINICZAK; CASLAKE, 2011). As determinações de ApoA-I e ApoB podem ser úteis na avaliação do risco de doença cardiovascular em pacientes com síndrome metabólica (DOMINICZAK; CASLAKE, 2011).

Em adição à concentração plasmática, ApoA-I pode ser marcador de aterosclerose quando oxidada. Formas alteradas de HDL aumentam quando a ApoA-I é oxidada pela mieloperoxidase, uma heme enzima produzida por macrófagos (CHAIT et al., 2005). Estudos demonstram que a concentração plasmática de ApoA-I é inversamente associada com risco cardiovascular (DOMINICZAK; CASLAKE, 2011).

Em humanos, os níveis de ApoA-I e HDL também estão reduzidos durante a inflamação aguda, bem como em condições associadas com inflamação crônica, como obesidade e síndrome metabólica. Proteínas de fase aguda negativas como a ApoA-I tem recebido menor atenção como marcador de inflamação, do que as proteínas de fase aguda positivas como CPR e SAA. A ApoA-I, a principal apolipoproteína da HDL, diminui durante a inflamação aguda e crônica. A proteína de fase aguda SAA pode deslocar ApoA-I da HDL *in vitro* (CHAIT et al., 2005).

3.3.2. APOLIPOPROTEÍNA B (ApoB)

A apolipoproteína B (ApoB) é a principal apolipoproteína estrutural da LDL. A ApoB100 serve como marcador das partículas de VLDL e LDL (DOMINICZAK; CASLAKE, 2011). Mudanças estruturais da ApoB foram identificadas em partículas de LDL(-) (MELLO et al., 2011).

A concentração plasmática da ApoB é positivamente associada com o risco cardiovascular. A relação ApoB/ApoA-I tem sido interpretada, à semelhança da relação colesterol total/HDL-colesterol, como reflexo do balanço entre o potencial aterogênico de VLDL, IDL e LDL e o efeito anti-aterogênico da HDL. As determinações de ApoA-I e ApoB podem ser úteis na avaliação do risco de doença cardiovascular em pacientes com síndrome metabólica (DOMINICZAK; CASLAKE, 2011).

3.3.3. APOLIPOPROTEÍNA E (ApoE)

A apolipoproteína E (ApoE) está amplamente distribuída em todas as classes de lipoproteínas e presente nas quilomícrons, VLDL, LDL e HDL. Aproximadamente, 60% da ApoE plasmática está presente na HDL, para trocas com outras lipoproteínas. Também é sintetizada por macrófagos, incluindo aqueles presentes em lesões ateroscleróticas. A ApoE controla o fluxo de colesterol das células, juntamente com a ApoA-I (DOMINICZAK; CASLAKE, 2011).

Os estudos relacionados com ApoE concentram-se mais na identificação de suas isoformas do que na sua concentração plasmática, pois esta pode sofrer influência da dieta. Não há evidências claras sugerindo o uso da concentração de ApoE rotineiramente, apesar de alguns estudos demonstrarem a associação entre genótipos de ApoE e a doença cardiovascular (DOMINICZAK; CASLAKE, 2011).

4.OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo foi avaliar a concentração de biomarcadores emergentes de risco cardiovascular relacionados com modificações das lipoproteínas, LDL(-) e as formas oxidadas de LDL (LDL-oxi, LDL-HNE e LDL-CML); de biomarcadores emergentes relacionados com a resposta imune-inflamatória no processo aterosclerótico, anti-LDL(-)-IgG, anti-LDL(-)-IgM, IC-LDL(-), SAA e MPO; e de biomarcadores não tradicionais relacionados às apolipoproteínas, ApoA-I, ApoB e ApoE em amostras de soro ou plasma de indivíduos com a infecção pelo HIV, tratados ou não com terapia antirretroviral (TARV) altamente potente.

O estudo avaliou se o perfil de biomarcadores emergentes e não tradicionais de risco cardiovascular em indivíduos com infecção pelo HIV, tratados (HIV-TARV) ou não tratados (HIV-NT) apresentou alterações, quando comparados com indivíduos sem infecção pelo HIV (controle).

Além disso, analisou-se a presença de associações entre os biomarcadores emergentes e os não tradicionais na amostragem deste estudo.

Por fim, buscou-se identificar a influência da infecção pelo HIV e da TARV na concentração dos biomarcadores emergentes, marcadores de modificações lipídicas e de inflamação, e não tradicionais de risco cardiovascular, bem como da TARV nestes marcadores.

5. CASUÍSTICA E MÉTODOS

5.1. CASUÍSTICA

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP), com cadastro no site da Plataforma Brasil (<http://www.saude.gov.br/plataformabrasil>) e número CAAE 25639513.9.0000.0067 (Anexo II-A).

As amostras de plasma e soro utilizadas foram obtidas a partir de banco de material biológico conservado em freezer -80°C, que foi estabelecido na realização do Projeto de Pesquisa intitulado “Avaliação de Ateromatose Subclínica em Pacientes HIV/aids: Determinação da Velocidade de Onda de Pulso e da Espessura Média Íntima de Carótidas” (Registro CEP-HU/USP: 807/08, Registro SISNEP-CAAE: 0019.0.198.015-08, Anexo II-B).

Os participantes deste estudo foram divididos em 3 grupos:

- ⇒ Indivíduos com infecção pelo HIV tratados (n= 29) com TARV altamente potente, incluindo inibidor de protease ou inibidor de transcriptase reversa não análogo a nucleosídeo/nucleotídeo; denominado grupo HIV-TARV.
- ⇒ Indivíduos com infecção pelo HIV (n= 28) sem uso de TARV, denominado grupo HIV-NT.
- ⇒ Indivíduos sem infecção pelo HIV (n= 32), funcionários da Universidade de São Paulo ou instituições associadas; denominado grupo controle.

Os critérios de inclusão e exclusão foram relacionados no momento da seleção dos participantes, sendo apresentados no Anexo IV (EIRA, 2009). A TARV utilizada pelos indivíduos com infecção pelo HIV (grupo HIV-TARV) foi composta por combinações de medicamentos, conforme apresentado na TABELA 2, sendo o período médio de tratamento para a maioria dos indivíduos (82,7%) de 6 a 15 anos.

TABELA 2: Combinações de Terapias Antirretrovirais Utilizadas pelos Indivíduos com Infecção pelo HIV (Grupo HIV-TARV).

Terapia Antirretroviral Altamente Potente (n= 29)		
Zidovudina (AZT) e Lamivudina (n= 19)	+ Efavirenz (n= 8)	
	+ Lopinavir (Kaletra) e Ritonavir (n= 7)	
	+ Atazanavir e Ritonavir (n= 2)	
	+ Estavudina e Efavirenz (n= 1)	
	+ Darunavir e Ritonavir (n= 1)	+ Vicriviroc (n= 1)
Lamivudina (3TC) (n= 8)	+ Tenofovir (n= 6)	+ Lopinavir (Kaletra) e Ritonavir (n= 4) + Vicriviroc (n= 1)
	+ Didanosina (n= 1)	+ Darunavir e Ritonavir (n= 1) + Abacavir (n= 1)
	+ Estavudina (n= 1)	+ Efavirenz (n= 1) + Vicriviroc (n= 1)
		+ Lopinavir (Kaletra) e Ritonavir (n= 1)
		+ Efavirenz (n= 1)
Tenofovir (n= 2)	+ Emtricitabina (n=2)	+ Lopinavir (Kaletra) e Ritonavir (n= 1) + Atazanavir e Ritonavir (n= 1)

As características demográficas, clínicas, laboratoriais e funcionais para os grupos controle, HIV-NT e HIV-TARV foram apresentadas nas TABELAS I a XIII do Anexo V (EIRA, 2009). O banco de dados demográficos, clínicos e laboratoriais do Projeto de Pesquisa (Anexo II-B) foi gentilmente cedido pelo responsável do estudo anterior, para complementação das informações do presente estudo.

O perfil demográfico dos grupos foi semelhante e não foram identificadas diferenças significativas quanto a gênero, idade, peso, altura, índice de massa corpórea e tabagismo. Os grupos apresentaram frequências semelhantes quanto ao diagnóstico prévio de hipertensão e diabetes (EIRA, 2009).

5.2. DETERMINAÇÃO DE BIOMARCADORES POR ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)

Este estudo baseou-se na utilização de reagentes para ensaio imunoenzimático (ELISA) produzidos pelo grupo de Pesquisa em Bioquímica Clínica (Prof^ª Dr^ª Dulcineia S. P. Abdalla) do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP, bem como em reagentes comerciais para os biomarcadores selecionados.

Foram realizadas determinações para os biomarcadores emergentes de risco cardiovascular relacionados com modificações lipídicas, ou seja, LDL eletronegativa [LDL(-)] e formas oxidadas da LDL, ou seja, LDL-oxi (resíduos lisina da

apolipoproteína B100 – ApoB100 – modificados com malondialdeído), LDL-HNE (resíduos lisina da ApoB100 modificados com 4-hidroxinonenal) e LDL-CML (resíduos lisina da ApoB100 modificados por carboximetila) e biomarcadores relacionados com a resposta imune-inflamatória, ou seja, autoanticorpos IgG e IgM anti-LDL(-), imunocomplexos de LDL(-) [IC-LDL(-)], proteína amiloide sérica A (SAA) e mieloperoxidase (MPO). Também foram determinadas as concentrações séricas dos biomarcadores de risco relacionados às lipoproteínas: apolipoproteína A-I (ApoA-I), apolipoproteína B (ApoB) e apolipoproteína E (ApoE).

5.2.1. DETERMINAÇÃO DE BIOMARCADORES DE MODIFICAÇÃO DA LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE

5.2.1.1. *ELISA PARA LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE ELETRONEGATIVA [LDL(-)]*

A FIGURA 6 esquematiza o ELISA utilizado na determinação LDL(-), conforme protocolo desenvolvido no laboratório de pesquisa em Bioquímica Clínica da FCF-USP (FAULIN, 2010). Os anticorpos monoclonais (MAb) específicos anti-LDL(-) 1A3H2 e 2C7D5F10 foram obtidos em hibridomas de camundongo, conforme protocolo estabelecido anteriormente (TELLES, 2008).

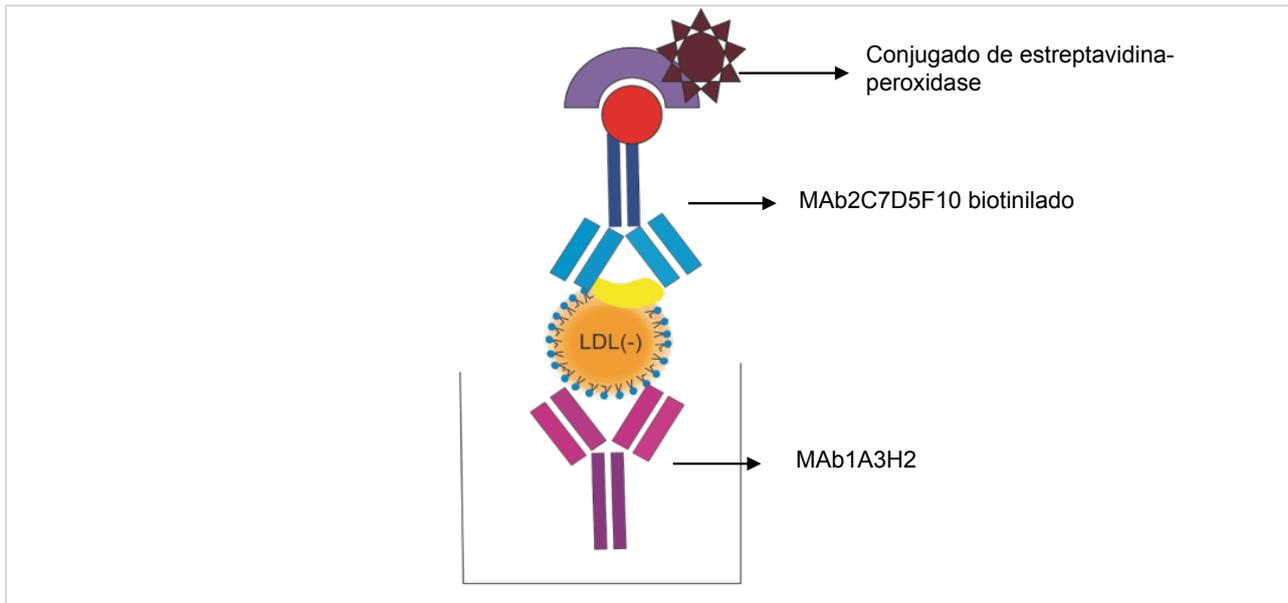


FIGURA 6: Representação Esquemática do Ensaio Imunoenzimático para Determinação de Lipoproteína de Baixa Densidade Eletronegativa. Placa foi sensibilizada com MAb1A3H2 para captura de LDL(-) presente nas amostras, que posteriormente ligou-se ao MAb2C7D5F10 biotilado. Após adição de estreptavidina conjugada com peroxidase, a reação foi revelada com substrato OPD. LDL(-): lipoproteína de baixa de densidade eletronegativa; MAb: anticorpo monoclonal; OPD: o-fenilenediamina dihidrocloro

A placa de poliestireno (Corning Costar; número de catálogo 3590) foi sensibilizada com 10µg/mL de MAb1A3H2 diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,05M pH9,6 (50µL/poço) e incubadas a 4°C *overnight* (16 a 18h). Após esse período, a placa foi lavada 3 vezes com 200µL de tampão PBS pH7,4 com tween₂₀ 0,05% (TP Washer Basic, ThermoPlate). Os sítios remanescentes foram bloqueados com 150µL de leite desnatado a 2% (BioRad®) em tampão PBS pH7,4 com tween₂₀ 0,01% e a placa incubadas a 37°C por 1h30min. Após ciclo de lavagem como descrito anteriormente, as amostras de plasma foram diluídas 1:1000 em leite desnatado a 1% em tampão PBS pH7,4 com tween₂₀ 0,01% e foram adicionadas em triplicata aos poços da placa (50µL). A curva-padrão foi preparada com LDL(-) nas concentrações de 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625 e 0,313µg/mL também diluídas em leite desnatado a 1% em tampão PBS pH7,4 com tween₂₀ 0,01%. O branco da reação foi obtido com leite desnatado a 1% em tampão PBS pH7,4 com tween₂₀ 0,01%. Incubou-se a placa a 37°C por 1h30min e após o ciclo de lavagem, foi adicionado conjugado de MAb2C7D5F10-biotilado anti-LDL(-) humana na concentração de 10µg/mL diluído em leite desnatado a 1% em tampão PBS pH7,4 com tween₂₀ 0,01% (50µL) para nova incubação a 37°C por 1h. A placa foi, então, lavada e posteriormente acrescentou-se 50µL de conjugado de estreptavidina-peroxidase (Invitrogen®) diluído 1:100000 para

outra incubação a 37°C por 1h. Após esse período, a placa foi lavada 4 vezes com tampão PBS pH7,4 com tween₂₀ 0,05%, deixando-se o tampão por mais 30 segundos no último ciclo de lavagem. Após esta etapa, adicionou-se 50µL de substrato OPD (Sigma[®]) em tampão citrato-fosfato pH5,3 e peróxido de hidrogênio por 15min a 37°C. O desenvolvimento de cor foi interrompido com solução de H₂SO₄ 2M e a leitura final realizada a 492nm (Synergy 2, BioTek Instruments).

5.2.1.2. *ELISA PARA LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE OXIDADA MODIFICADA POR MALONDIALDEÍDO (LDL-oxi)*

A determinação de LDL-oxidada (LDL-oxi) humana foi realizada com “*Mercodia Oxidized LDL ELISA*” (Mercodia, número de catálogo 10-1143-01). O método utilizado é ELISA tipo sanduíche com anticorpos monoclonais específicos (MAb4E6) para determinação de LDL-oxi em amostras de soro e plasma.

As amostras de soro foram diluídas 1:6561 e os padrões para curva de calibração foram preparados nas concentrações de 23,8, 12,8, 6,32, 3,13, 1,47 e 0mU/L. Aos orifícios da placa cobertos com anticorpo monoclonal específico para LDL-oxi, foram adicionadas as pré-diluições de amostras, controle baixo, controle alto e calibradores (25µL), em duplicatas, e posteriormente preenchidos com 100µL de diluente de ensaio. Após incubação por 2h a temperatura ambiente com agitação (SI-600, Lab. Companion), a placa foi lavada 6 vezes com 700µL de tampão de lavagem (Atlantis 2 Asys, Biochrom). Então, foi incubada com 100µL de anti-apolipoproteína B humana conjugado com peroxidase por 1h a temperatura ambiente com agitação. Após novo ciclo de lavagem, conforme descrito na etapa anterior, foi adicionado 200µL de solução substrato TMB para incubação por 15min a temperatura ambiente sem agitação. A reação foi bloqueada com 50µL de solução de parada e a leitura final das absorbâncias realizada a 450nm (Sunrise, Tecan). Os resultados foram calculados com *software* Microsoft[®] Excel[®] para Mac 2011, versão 14.6.3.

5.2.1.3. *ELISA PARA LIPOPROTEÍNA BAIXA DENSIDADE MODIFICADA POR 4-HIDROXINONENAL (LDL-HNE)*

A determinação de LDL-HNE humana foi realizada com “*OxiSelect™ Human Oxidized LDL ELISA Kit (HNE-LDL Quantitation)*” (Cell Biolabs, número de catálogo STA-389). O método foi baseado em ELISA tipo sanduíche com anticorpos anti-HNE específicos para determinação de LDL-oxi em amostras de soro e plasma.

Amostras de soro foram tratadas com solução precipitante (1:1) por 5min a temperatura ambiente e posteriormente centrifugadas a 2000g por 20min (EBA 12, Hettich Zentrifugen). Após descarte do sobrenadante, o precipitado foi dissolvido em volume padronizado de tampão PBS e diluído 1:100 em tampão de diluição de ensaio. Os padrões para curva de calibração foram preparados nas concentrações de 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,313, 0,156 e 0µg/mL. Aos orifícios da placa cobertos com anticorpo anti-HNE, foram adicionadas as diluições de amostras e calibradores (100µL) em duplicata. Após incubação por 1h a temperatura ambiente com agitação (SI-600, Lab. Companion), a placa foi lavada 3 vezes com 250µL de tampão de lavagem (Atlantis 2 Asys, Biochrom). Então, foi adicionado 100µL de reagente bloqueador para a próxima incubação por 1h a temperatura ambiente com agitação. Após esse período, a placa foi lavada 5 vezes com 250µL de tampão de lavagem, para adição de 100µL de anticorpo anti-ApoB100 humana biotilado com outra incubação por 1h a temperatura ambiente com agitação. Um novo ciclo de lavagem foi realizado, conforme descrito na etapa anterior, para incubação com 100µL de conjugado enzimático de estreptavidina por 1h a temperatura ambiente com agitação. Após lavagem final, conforme etapa anterior, foi acrescentado 100µL de solução substrato para incubação por 15 a 20min a temperatura ambiente com agitação. A reação enzimática foi bloqueada com 100µL de solução de parada, sendo a leitura da absorbância realizada a 450nm (Sunrise, Tecan). Os resultados foram calculados com software Microsoft® Excel® para Mac 2011, versão 14.6.3.

5.2.1.4. *ELISA PARA LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE MODIFICADA POR CARBOXIMETILA (LDL-CML)*

A determinação de LDL-CML humana foi realizada com o reagente “*OxiSelect™ Human Oxidized LDL ELISA Kit (CML-LDL Quantitation)*” (Cell Biolabs, número de catálogo STA-389). O método foi baseado em ELISA tipo sanduíche com anticorpos anti-CML específicos para determinação de LDL-CML em amostras de soro e plasma.

Amostras de soro foram tratadas com solução precipitante (1:1) por 5min a temperatura ambiente e posteriormente centrifugadas a 2000g por 20min (EBA 12, Hettich Zentrifugen). Após descarte do sobrenadante, o precipitado foi dissolvido em volume padronizado de tampão PBS e diluído 1:100 em tampão de diluição de ensaio. Os padrões para curva de calibração foram preparados nas concentrações de 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,313, 0,156 e 0µg/mL. Aos orifícios da placa cobertos com anticorpo anti-CML, foram adicionadas as diluições de amostras e calibradores (100µL) em duplicata. Após incubação por 1h a temperatura ambiente com agitação (SI-600, Lab. Companion), a placa foi lavada 3 vezes com 250µL de tampão de lavagem (Atlantis 2 Asys, Biochrom). Então, foi adicionado 100µL de reagente bloqueador para a próxima incubação por 1h a temperatura ambiente com agitação. Após esse período, a placa foi lavada 5 vezes com 250µL de tampão de lavagem, para adição de 100µL de anticorpo anti-ApoB100 humana biotilado com outra incubação por 1h a temperatura ambiente com agitação. Um novo ciclo de lavagem foi realizado, conforme descrito na etapa anterior, para incubação com 100µL de conjugado enzimático de estreptavidina por 1h a temperatura ambiente com agitação. Após lavagem final, conforme etapa anterior, foi acrescentado 100µL de solução substrato para incubação por 15 a 20min a temperatura ambiente com agitação. A reação enzimática foi bloqueada com 100µL de solução de parada, sendo a leitura da absorbância realizada a 450nm (Sunrise, Tecan). Os resultados foram calculados com software Microsoft® Excel® para Mac 2011, versão 14.6.3.

5.2.2. DETERMINAÇÃO DE BIOMARCADORES DE RESPOSTA IMUNE-INFLAMATÓRIA E ESTRESSE OXIDATIVO

5.2.2.1. ELISA PARA AUTOANTICORPOS ANTI-LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE ELETRONEGATIVA [ANTI-LDL(-)]

A FIGURA 7 apresenta a representação esquemática dos ELISAs utilizados para as determinações de autoanticorpos das classes IgG e IgM anti-LDL(-).

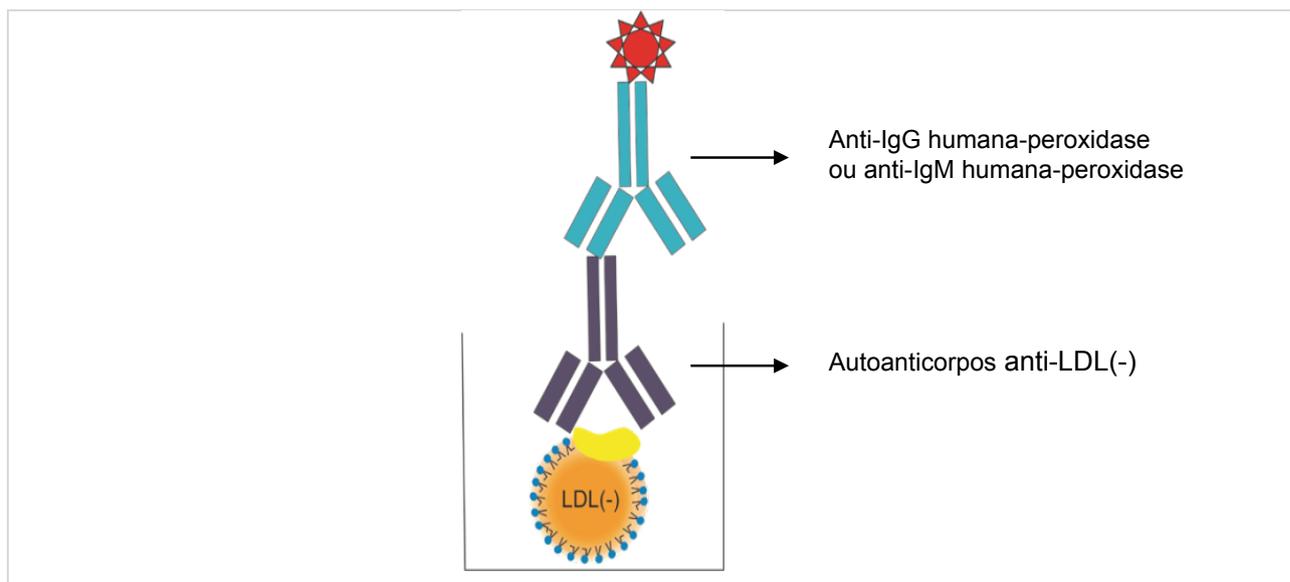


FIGURA 7: Representação Esquemática dos Ensaio Imunoenzimáticos para Determinações de Autoanticorpos IgG e IgM Anti-Lipoproteína de Baixa Densidade Eletronegativa. Placa foi sensibilizada com LDL(-), que posteriormente ligou-se aos autoanticorpos presentes nas amostras. Após adição de anti-IgG ou anti-IgM humana conjugado com peroxidase, a reação foi revelada com substrato TMB.

Anti-LDL(-): autoanticorpos anti-lipoproteína de baixa de densidade eletronegativa; **IgG:** imunoglobulina G; **IgM:** imunoglobulina M; **LDL(-):** lipoproteína de baixa de densidade eletronegativa; **TMB:** 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina

5.2.2.1.1. ELISA PARA AUTOANTICORPOS IgG ANTI-LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE ELETRONEGATIVA [ANTI-LDL(-)-IgG]

Este ELISA foi desenvolvido no laboratório de pesquisa em Bioquímica Clínica da FCF-USP (FAULIN, 2010). A placa de poliestireno (Corning Costar; número de catálogo 3590) foi sensibilizada com 1µg/mL de LDL(-) em tampão carbonato-bicarbonato 0,05M pH9,6 (50µL/poço) e incubada a 4°C overnight (16 a 18h). Após

esse período, a placa foi lavada 3 vezes com 250µL/poço de tampão PBS pH7,4 com tween₂₀ 0,05% (Atlantis 2 Asys, Biochrom). Em seguida, os sítios remanescentes foram bloqueados com 150µL de leite desnatado a 2% (BioRad®) em tampão PBS pH7,4 com tween₂₀ 0,01% e posterior incubação da placa a 37°C por 1h30min. Após novo ciclo de lavagem como descrito anteriormente, as amostras de plasma diluídas 1:100 em leite desnatado a 1% em tampão PBS pH7,4 com tween₂₀ 0,01% foram adicionadas aos poços da placa (50µL). Também foram adicionadas as diluições da curva-padrão com MAb2C7D5F10 (50µL) nas concentrações de 0,125, 0,063, 0,031, 0,016, 0,008, 0,004 e 0,002µg/mL diluídas em leite desnatado a 1% em tampão PBS pH7,4 com tween₂₀ 0,01%. O branco da reação (50µL) foi obtido com leite desnatado a 1% em tampão PBS pH7,4 com tween₂₀ 0,01%. As amostras e os pontos da curva-padrão foram processados em triplicatas. Então, a placa foi incubada a 37°C por 1h30min e lavada novamente. Na etapa seguinte, foi adicionado 50µL de anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Invitrogen™) no título de 1:500 aos poços com pontos da curva-padrão e 50µL de anti-IgG humana conjugado com peroxidase (Invitrogen™) no título de 1:3000 aos poços de amostras, ambos preparados em leite desnatado a 1% em tampão PBS pH7,4 com tween₂₀ 0,01%. Após incubação a 37°C por 1h, a placa foi lavada e acrescentado 50µL de substrato TMB (Sigma®) por 10min a 37°C. O desenvolvimento de cor foi interrompido com 50µL de solução de H₂SO₄ 0,5M e a leitura final realizada a 450nm (Sunrise, Tecan). Os resultados foram calculados com software Microsoft® Excel® para Mac 2011, versão 14.6.3.

5.2.2.1.2. *ELISA PARA AUTOANTICORPOS IgM ANTI-LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE ELETRONEGATIVA [ANTI-LDL(-)-IgM]*

Este ensaio foi baseado em ELISA desenvolvido no laboratório de pesquisa em Bioquímica Clínica da FCF-USP (FAULIN, 2010). A placa de poliestireno (Corning Costar; número de catálogo 3590) foi sensibilizada com 1µg/mL de LDL(-) em tampão carbonato-bicarbonato 0,05M pH9,6 (50µL/poço) e incubada a 4°C overnight (16 a 18h). Após esse período, a placa foi lavada 3 vezes com 250µL/poço de tampão PBS pH7,4 com tween₂₀ 0,05% (Atlantis 2 Asys, Biochrom). Em seguida, os sítios remanescentes foram bloqueados com 150µL de leite desnatado a 2% (BioRad®) em

tampão PBS pH7,4 com tween₂₀ 0,01% e incubação da placa a 37°C por 1h30min. Após novo ciclo de lavagem como descrito anteriormente, as amostras de plasma diluídas 1:200 em leite desnatado a 1% em tampão PBS pH7,4 com tween₂₀ 0,01% foram adicionadas aos poços da placa (50µL). Também foram adicionadas as diluições da curva-padrão com MAb2C7D5F10 (50µL) nas concentrações de 0,125, 0,063, 0,031, 0,016, 0,008, 0,004 e 0,002µg/mL diluídas em leite desnatado a 1% em tampão PBS pH7,4 com tween₂₀ 0,01%. O branco da reação (50µL) foi obtido com leite desnatado a 1% em tampão PBS pH7,4 com tween₂₀ 0,01%. As amostras e os pontos da curva-padrão foram processados em triplicatas. Então, a placa foi incubada a 37°C por 1h30min e lavada novamente. Na etapa seguinte, foi adicionado 50µL de anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Invitrogen™) no título de 1:500 aos poços com pontos da curva-padrão e 50µL de anti-IgM humana conjugado com peroxidase (Invitrogen™) no título de 1:1000 aos poços de amostras, ambos preparados em leite desnatado a 1% em tampão PBS pH7,4 com tween₂₀ 0,01%. Após incubação a 37°C por 1h, a placa foi lavada e acrescentado 50µL de substrato TMB (Sigma®) por 10min a 37°C. O desenvolvimento de cor foi interrompido com 50µL de solução de H₂SO₄ 0,5M e a leitura final realizada a 450nm (Sunrise, Tecan). Os resultados foram calculados com software Microsoft® Excel® para Mac 2011, versão 14.6.3.

5.2.2.2. ELISA PARA IMUNOCOMPLEXOS DE LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE ELETRONEGATIVA [IC-LDL(-)]

A FIGURA 8 apresenta o esquema para o ELISA utilizado na determinação de IC-LDL(-), conforme protocolo desenvolvido no laboratório de pesquisa em Bioquímica Clínica da FCF-USP (FAULIN et al., 2012; FAULIN, 2010).

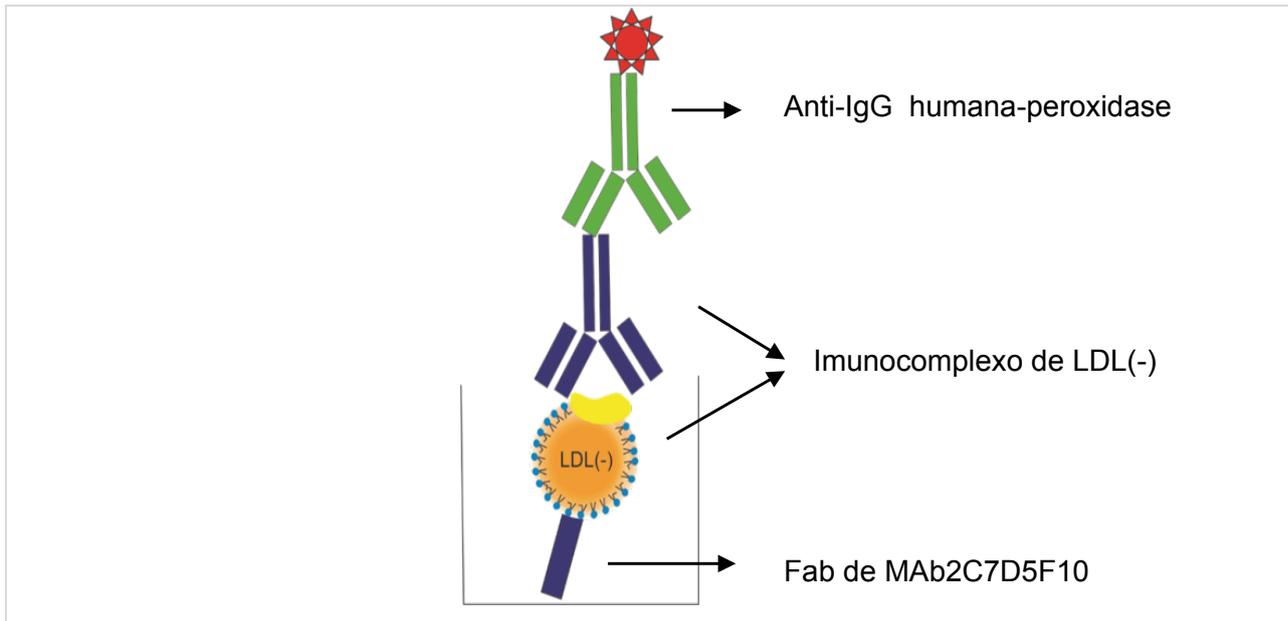


FIGURA 8: Representação Esquemática do Ensaio Imunoenzimático para Determinação de Imunocomplexos de Lipoproteína de Baixa Densidade Eletronegativa. Placa foi sensibilizada com Fab de MAb2C7D5F10, que posteriormente ligou-se aos Imunocomplexos de LDL(-) presentes nas amostras. Após adição de anti-IgG humana conjugado com peroxidase, a reação foi revelada com substrato TMB.

Fab: fragmento de ligação ao antígeno; **IgG:** imunoglobulina G; **LDL(-):** lipoproteína de baixa de densidade eletronegativa; **MAb:** anticorpo monoclonal; **TMB:** 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina

A placa de poliestireno (Corning Costar; número de catálogo 3590) foi sensibilizada com 10µg/mL de Fab de MAb2C7D5F10 em tampão carbonato-bicarbonato 0,05M pH9,6 (50µL/poço) e incubada a 4°C overnight (16 a 18h). Após esse período, a placa foi lavada 5 vezes com 200µL/poço de tampão PBS pH7,4 com tween₂₀ 0,05% (TP Washer Basic, ThermoPlate), deixando de molho por 30 segundos na última lavagem. Em seguida, os sítios remanescentes foram bloqueados com 150µL de leite desnatado a 5% (BioRad®) em tampão PBS pH7,4 com tween₂₀ 0,01% e incubação da placa a 37°C por 1h30min. Após novo ciclo de lavagem como descrito anteriormente, as amostras de plasma diluídas 1:11 em leite desnatado a 1% em tampão PBS pH7,4 com tween₂₀ 0,01% foram adicionadas aos poços da placa (50µL). Também foram adicionadas as diluições da curva-padrão com IgG total (50µL) nas concentrações de 800, 400, 200, 100, 50, 25, 12,5 e 6,25mg/dL em leite desnatado a 1% em tampão PBS pH7,4 com tween₂₀ 0,01%. O branco da reação (50µL) foi obtido com leite desnatado a 1% em tampão PBS pH7,4 com tween₂₀ 0,01%. As amostras e os pontos da curva-padrão foram processados em triplicatas. Então, a placa foi incubada a 37°C por 1h30min e lavada novamente. Na etapa seguinte, foi adicionado 50µL de anti-Fc de IgG humana conjugado com peroxidase (Sigma®) no título de

1:1000 em leite desnatado a 1% em tampão PBS pH7,4 com tween₂₀ 0,01%. Após incubação a 37°C por 1h, a placa foi lavada e acrescentado 50µL de substrato TMB (Sigma®) por 10min a 37°C. O desenvolvimento de cor foi interrompido com 50µL de solução de H₂SO₄ 0,5M e a leitura final realizada a 450nm (Synergy 2, BioTek Instruments). Os resultados foram calculados com software Microsoft® Excel® para Mac 2011, versão 14.6.3.

5.2.2.3. ELISA PARA PROTEÍNA AMILÓIDE SÉRICA A (SAA)

A determinação de SAA humana foi realizada com “*Human SAA ELISA Kit*” (Invitrogen™, número de catálogo KHA0011). O método foi baseado em ELISA tipo sanduíche com anticorpo monoclonal específico para determinação de SAA em amostras de soro e plasma.

Amostras de soro foram diluídas 1:200 em tampão de diluição e os padrões para curva de calibração preparados nas concentrações de 600, 300, 150, 75, 37,5, 18,8, 9,4 e 0ng/mL. Aos orifícios da placa cobertos com anticorpo anti-SAA humana, foram adicionados 100µL de tampão de diluição, 100µL das diluições de amostras e calibradores em duplicata e 50µL de conjugado biotilado de SAA-biotina. Após incubação por 2h a temperatura ambiente, a placa foi lavada 4 vezes com 400µL de tampão de lavagem (Atlantis 2 Asys, Biochrom). Então, foi adicionado 100µL de solução de estreptavidina-peroxidase para nova incubação por 30min a temperatura ambiente. Após esse período, a placa foi lavada novamente, conforme descrito anteriormente, sendo adicionado 100µL de solução de cromógeno estabilizado para incubação por 30min a temperatura ambiente protegido da luz. A reação enzimática foi bloqueada com 100µL de solução de parada, sendo a leitura da absorbância realizada a 450nm (Sunrise, Tecan). Os resultados foram calculados com software Microsoft® Excel® para Mac 2011, versão 14.6.3.

5.2.2.4. ELISA PARA MIELOPEROXIDASE (MPO)

A determinação da concentração sérica de mieloperoxidase (MPO) humana foi realizada com “*Quantikine® ELISA Human Myeloperoxidase Immunoassay*”

(R&D Systems, número de catálogo DMYE00B). Utiliza-se um ELISA tipo sanduíche com anticorpos monoclonais específicos para determinação de MPO em amostras de soro e plasma.

As amostras de soro foram diluídas 1:51. Os padrões para curva de calibração foram diluídos nas concentrações de 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,313 e 0,156ng/mL. Os orifícios da placa cobertos com anticorpo monoclonal específico para MPO foram preenchidos com 100µL de diluente de ensaio e, posteriormente, adicionadas as pré-diluições de amostras e calibradores (50µL). Após incubação por 2h a temperatura ambiente com agitação, a placa foi lavada 4 vezes com 400µL de tampão de lavagem (TP Washer Basic, ThermoPlate). Então, a placa foi incubada com 200µL de conjugado de anticorpo policlonal específico para MPO por 2h a temperatura ambiente com agitação. Após novo ciclo de lavagem, como descrito anteriormente, foi adicionado 200µL de solução substrato para incubação da placa por 30min a temperatura ambiente sem agitação e protegido da luz. A produção de cor foi bloqueada com 50µL de solução de parada e a leitura final em 450nm (Synergy 2, BioTek Instruments). Os resultados foram calculados com ferramenta *online* para análise de dados com curva-padrão logística 4 parâmetros (“*Four Parameter Logistic Curve*”, MyAssays, Ltd., <http://www.myassays.com/four-parameter-logistic-curve.assay>, acesso em: 20/07/2014).

5.2.3. DETERMINAÇÃO DE BIOMARCADORES DE COMPOSIÇÃO PROTEICA DE LIPOPROTEÍNAS

5.2.3.1. ELISA PARA APOLIPOPROTEÍNA A-I (ApoA-I)

A determinação de apolipoproteína A-I (ApoA-I) humana foi realizada com “*Apolipoprotein AI (APOA1) Human ELISA Kit*” (Abnova[®], número de catálogo KA0460). O ensaio foi baseado em ELISA competitivo para determinação de ApoA-I em amostras de soro e plasma.

Amostras de soro foram diluídas 1:200. Os padrões para curva de calibração foram diluídos nas concentrações de 20; 10; 5; 2,5; 1,25 e 0µg/mL. As pré-diluições de amostras e calibradores foram adicionadas aos orifícios da placa cobertos

com anticorpo policlonal específico para ApoA-I (25µL) em duplicata. Adicionou-se, então, 25µL de proteína ApoA-I humana biotinizada em cada orifício da placa. Após incubação por 2h a temperatura ambiente, as placas foram lavadas 6 vezes com 300µL de tampão de lavagem (TP Washer Basic, ThermoPlate). Então, a foram adicionados 50µL de conjugado estreptavidina-peroxidase para incubação por 30min a temperatura ambiente. Após novo ciclo de lavagem, como descrito anteriormente, foi adicionado 50µL de solução substrato cromógeno para incubação por 15min a temperatura ambiente. A produção de cor foi bloqueada com 50µL de solução de parada, sendo a leitura final realizada em 450nm (Synergy 2, BioTek Instruments). Os resultados foram calculados com ferramenta *online* para análise de dados com curva-padrão logística 4 parâmetros (“Four Parameter Logistic Curve”, MyAssays, Ltd., <http://www.myassays.com/four-parameter-logistic-curve.assay>, acesso em: 12/10/2014).

5.2.3.2. ELISA PARA APOLIPOPROTEÍNA B (ApoB)

A determinação de apolipoproteína B (ApoB) humana foi realizada com “Quantikine® ELISA Human Apolipoprotein B / ApoB Immunoassay” (R&D Systems, número de catálogo DAPB00). O ensaio foi baseado em um ELISA tipo sanduíche com anticorpos monoclonais específicos para determinação de ApoB em amostras de plasma e soro.

As amostras de soro foram diluídas 1:1000. Os padrões para curva de calibração foram diluídos nas concentrações de 2500; 1250; 625; 313; 156; 78,1 e 39,1ng/mL. Os orifícios da placa cobertos com anticorpo específico para ApoB foram preenchidos com 200µL de diluente de ensaio e, posteriormente, foi adicionado 50µL das pré-diluições de amostras e calibradores. Após incubação por 2h a temperatura ambiente com agitação, a placa foi lavada 3 vezes com 400µL de tampão de lavagem (TP Washer Basic, ThermoPlate). Então, a placa foi incubada com 200µL do conjugado de anticorpo policlonal específico para ApoB por 2h a temperatura ambiente com agitação. Após novo ciclo de lavagens, como descrito na etapa anterior, foi adicionado 200µL de solução substrato para incubação da placa por 30min a temperatura ambiente sem agitação e protegido da luz. A produção de cor foi bloqueada com 50µL de solução de parada e a leitura final realizada em 450nm (Synergy 2, BioTek

Instruments). Os resultados foram calculados com ferramenta online para análise de dados com curva-padrão logística 4 parâmetros (“*Four Parameter Logistic Curve*”, MyAssays, Ltd., <http://www.myassays.com/four-parameter-logistic-curve.assay>, acesso em: 28/10/2014).

5.2.3.3. ELISA PARA APOLIPOPROTEÍNA E (ApoE)

A determinação dos níveis circulantes de apolipoproteína E (ApoE) humana foi realizada com “*Quantikine® ELISA Human Apolipoprotein E / ApoE Immunoassay*” (R&D Systems, número de catálogo DAPE00). O ensaio foi baseado em um ELISA tipo sanduíche com anticorpos policlonais específicos para determinação de ApoE em amostras de soro e plasma.

Amostras de soro foram diluídas 1:500. Os padrões para curva de calibração foram diluídos nas concentrações de 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,13ng/mL. Os orifícios da placa cobertos com anticorpo policlonal específico para ApoE foram preenchidos com 100µL de diluente de ensaio e, posteriormente, foi adicionado 50µL de pré-diluições de amostras e calibradores em duplicata. Após incubação por 3h a temperatura ambiente com agitação, a placa foi lavada 4 vezes com 400µL de tampão de lavagem (TP Washer Basic, ThermoPlate). Então, a placa foi incubada com 200µL de conjugado de anticorpo monoclonal específico para ApoE humana por 1h a temperatura ambiente com agitação. Após novo ciclo de lavagens, como descrito anteriormente, foi adicionado 200µL de solução substrato para incubação da placa por 30min a temperatura ambiente sem agitação e protegido da luz. A produção de cor foi bloqueada com 50µL solução de parada e a leitura final realizada em 450nm (Synergy 2, BioTek Instruments). Os resultados foram calculados com ferramenta *online* para análise de dados com curva-padrão logística 4 parâmetros (“*Four Parameter Logistic Curve*”, MyAssays, Ltd., <http://www.myassays.com/four-parameter-logistic-curve.assay>, acesso em: 28/10/2014).

5.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os biomarcadores foram analisados, sendo as variáveis separadas nos grupos controle, HIV-NT e HIV-TARV e avaliadas quanto ao tipo de distribuição, utilizando-se histogramas, valores de média, mediana, desvio-padrão e intervalo interquartil. Foi aplicado o teste de Kolmogorov-Smirnov e as avaliações de assimetria e curtose para se verificar a normalidade dos dados. Como os biomarcadores estudados nesta amostragem não se apresentaram normalmente distribuídos, foram aplicados testes não paramétricos para análise de diferenças e de associações entre as variáveis. Os resultados e gráficos foram apresentados com valores de mediana e intervalo interquartil.

As diferenças entre os grupos controle, HIV-NT e HIV-TARV foram avaliadas com o teste de Kruskal Wallis, sendo as diferenças estatisticamente significantes analisadas posteriormente com o teste LSD de Fisher (ANOVA para ordens, comparação múltipla das médias das ordens para identificação da menor diferença significativa entre os grupos). O estudo das associações entre as variáveis estudadas foi realizado pelo teste de correlação de Spearman (r_s).

O nível de significância para as análises estatísticas realizadas foi de 0,05 (5%). As avaliações foram realizadas utilizando-se os softwares SPSS 19 (SPSS Inc., Chicago, IL) ou Minitab[®] 17.1.0. Os gráficos foram elaborados com software GraphPad Prism[®] versão 5.03, 2009 para Windows (www.graphpad.com; San Diego, Califórnia) ou SPSS 19 (SPSS Inc., Chicago, IL). O banco de dados foi criado no *software* Microsoft[®] Excel[®] para Mac 2011, versão 14.6.3.

6.RESULTADOS

6.1. CARACTERÍSTICAS LABORATORIAIS DOS PARTICIPANTES DO ESTUDO

O grupo HIV-TARV apresentou diagnóstico prévio de hipercolesterolemia e uso de medicamento hipolipemiante, com concentrações aumentadas de triglicérides (FIGURA 9). Não foram identificadas diferenças significativas entre os grupos para concentração de PCR ultrasensível (FIGURA 10). Os grupos estudados não apresentaram co-infecção pelo vírus da hepatite B, sendo que apenas um indivíduo do grupo HIV-NT apresentou co-infecção pelo vírus da hepatite C. Não foram identificadas diferenças significativas entre os 3 grupos quanto à espessura média-íntima da carótidas direita e esquerda ou quanto à presença da placa aterosclerótica (FIGURA 11). O grupo HIV-TARV apresentou maior frequência de síndrome metabólica (41,4%) comparado com os grupos HIV-NT (25,0%) e controle (28,1%) (EIRA, 2009).

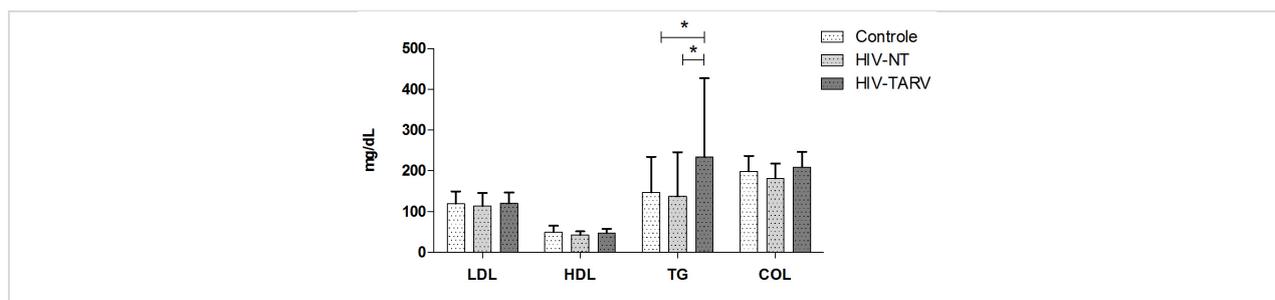


FIGURA 9: Perfil Lipêmico para Grupos Controle (n= 32), HIV-NT (n= 28) e HIV-TARV (n=29). Dados apresentados como média e desvio-padrão. Os valores de p foram determinados por ANOVA (*p<0,05).

ANOVA: análise de variância; **COL:** colesterol; **Controle:** indivíduos sem infecção pelo HIV; **HDL:** lipoproteína de alta densidade; **HIV-NT:** indivíduos com infecção pelo HIV não tratados com terapia antirretroviral; **HIV-TARV:** indivíduos com infecção pelo HIV tratados com terapia antirretroviral; **HIV:** vírus da imunodeficiência humana; **LDL:** lipoproteína de baixa densidade; **TG:** triglicerídeos

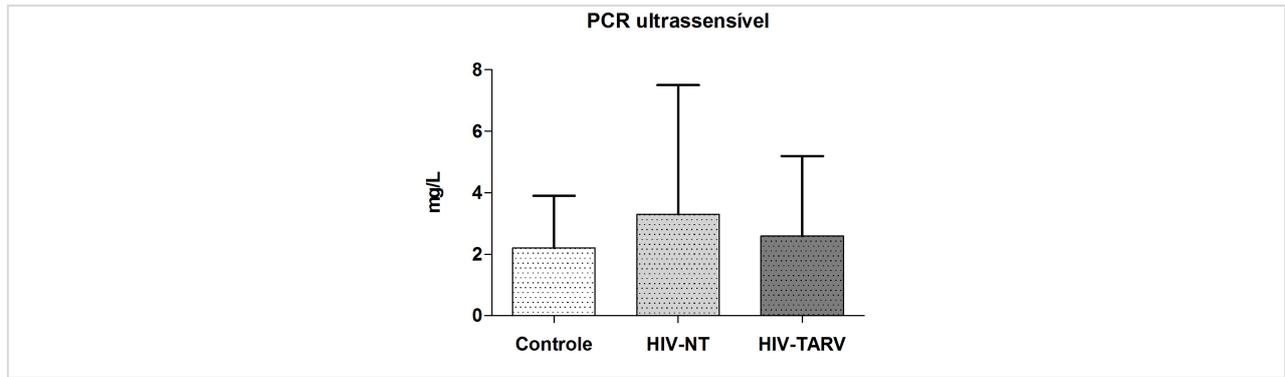


FIGURA 10: Concentração de Proteína C Reativa para Grupos Controle (n= 32), HIV-NT (n= 28) e HIV-TARV (n=29). Dados apresentados como média e desvio-padrão.

Controle: indivíduos sem infecção pelo HIV; **HIV-NT:** indivíduos com infecção pelo HIV não tratados com terapia antirretroviral; **HIV-TARV:** indivíduos com infecção pelo HIV tratados com terapia antirretroviral; **PCR:** proteína C reativa

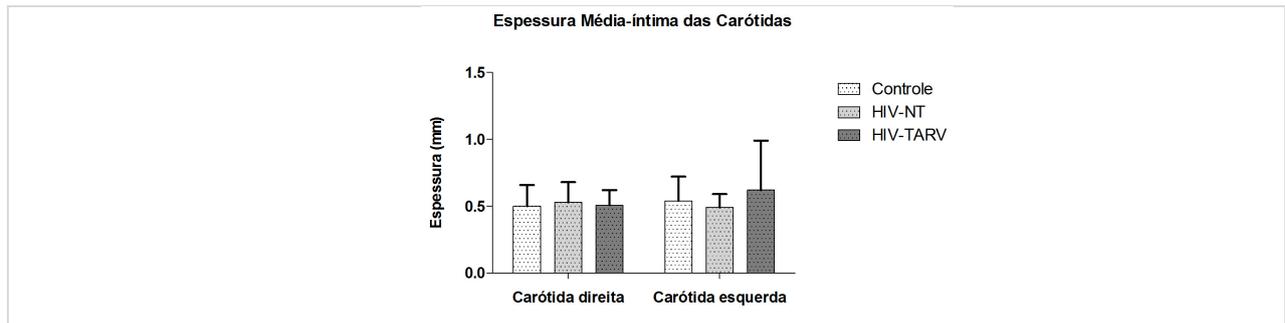


FIGURA 11: Espessura da Camada Média-Íntima das Artérias Carótidas Direita e Esquerda para Grupos Controle (n= 32), HIV-NT (n= 28) e HIV-TARV (n=29). Dados apresentados como média e desvio-padrão.

Controle: indivíduos sem infecção pelo HIV; **HIV-NT:** indivíduos com infecção pelo HIV não tratados com terapia antirretroviral; **HIV-TARV:** indivíduos com infecção pelo HIV tratados com terapia antirretroviral

6.2. PADRONIZAÇÃO DE ENSAIOS IMUNOENZIMÁTICOS PARA AUTOANTICORPOS ANTI-LDL(-) E IC-LDL(-)

6.2.1. ELISA PARA AUTOANTICORPOS IgG E IgM ANTI-LDL(-)

Para as determinações de autoanticorpos IgG e IgM anti-LDL(-) foram realizadas avaliações para verificação da padronização proposta anteriormente (FAULIN et al., 2012; FAULIN, 2010).

Para a etapa de sensibilização, foram analisadas as reações para as placas adsorvidas com 0,5, 1 e 2µg/mL de LDL(-), onde foi verificada a concentração adequada para adsorção nas placas de ELISA. Verificou-se que a concentração de

1µg/mL de LDL(-) pode ser mantida tanto para a determinação de anti-LDL(-)-IgG como de anti-LDL(-)-IgM.

Foi verificada também a curva de calibração com MAb2C7D5F10, sendo definidas as concentrações de 0,125, 0,063, 0,031, 0,016, 0,008, 0,004 e 0,002µg/mL para utilização nos dois ELISAs anti-LDL(-)-IgG e anti-LDL(-)-IgM. O título do conjugado o anti-IgG de camundongo com peroxidase (Invitrogen™), usado na padronização da curva-padrão, foi verificado para os títulos 1:500, 1:1000, 1:2000 e 1:4000. Verificou-se que a diluição de 1:500 apresentou os resultados esperados para elaboração da curva-padrão para os ensaios tanto de anti-LDL(-)-IgG como de anti-LDL(-)-IgM.

As FIGURAS 12, 13 e 14 apresentam as curvas de calibração obtidas nas padronizações realizadas para o ELISA de autoanticorpos IgG e IgM anti-LDL(-).

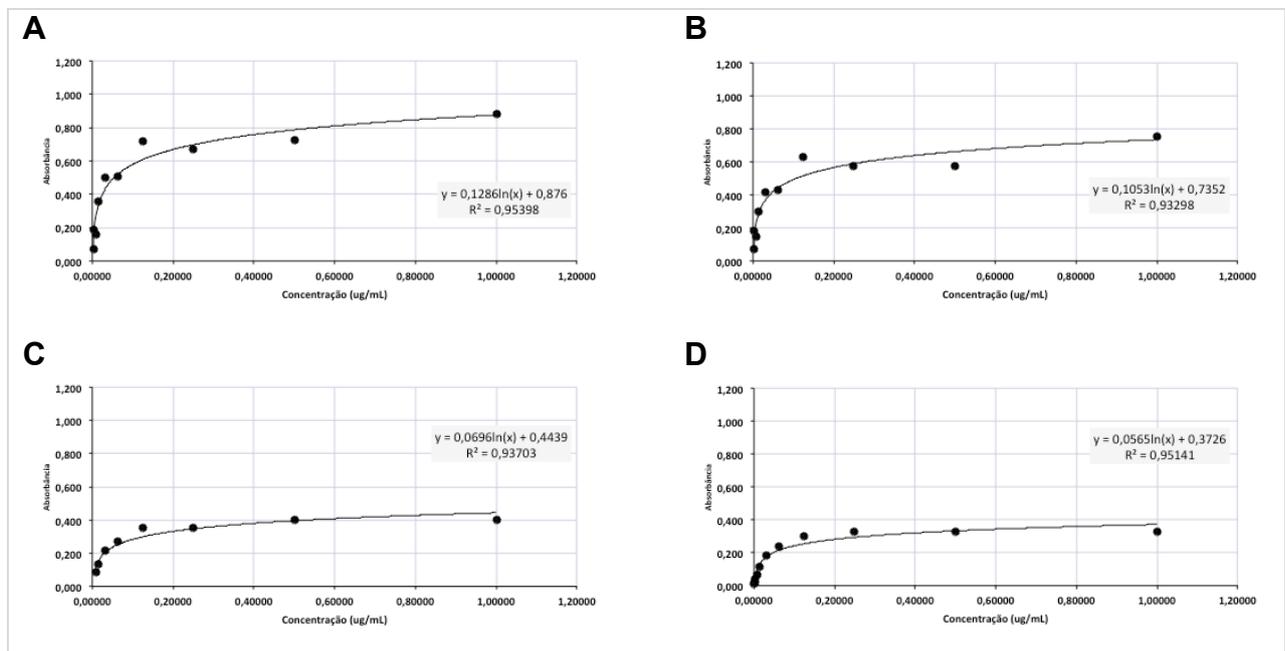


FIGURA 12: Curvas de Calibração Obtidas para ELISA de Autoanticorpos IgG e IgM Anti-LDL(-) com Placas Sensibilizadas com 0,5µg/mL de LDL(-) e Avaliação do Conjugado com Peroxidase (A) título 1/500, (B) título 1/1000, (C) título 1/2000 e (D) título 1/4000.

Anti-LDL(-): autoanticorpos anti-lipoproteína de baixa densidade eletronegativa; **ELISA:** ensaio imunoenzimático; **LDL(-):** lipoproteína de baixa densidade eletronegativa

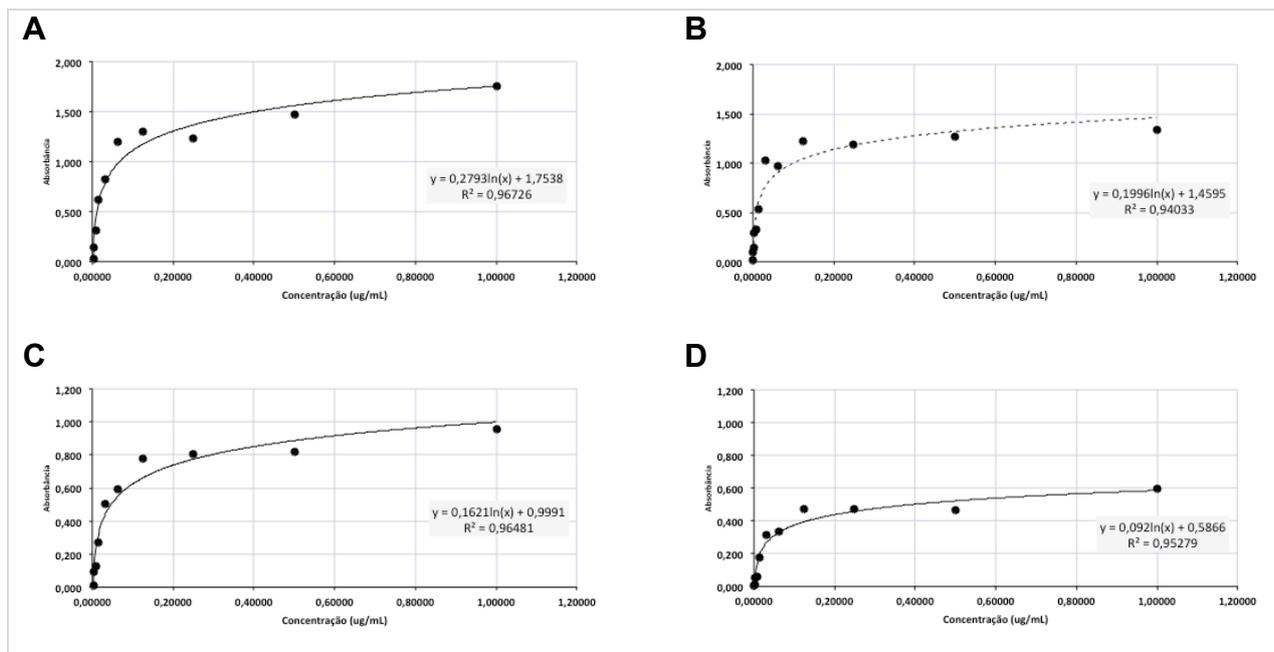


FIGURA 13: Curvas de Calibração Obtidas para ELISA de Autoanticorpos IgG e IgM Anti-LDL(-) com Placas Sensibilizadas com 1 μ g/mL de LDL(-) e Avaliação do Conjugado com Peroxidase (A) título 1/500, (B) título 1/1000, (C) título 1/2000 e (D) título 1/4000.

Anti-LDL(-): autoanticorpos anti-lipoproteína de baixa densidade eletronegativa; ELISA: ensaio imunoenzimático; LDL(-): lipoproteína de baixa densidade eletronegativa

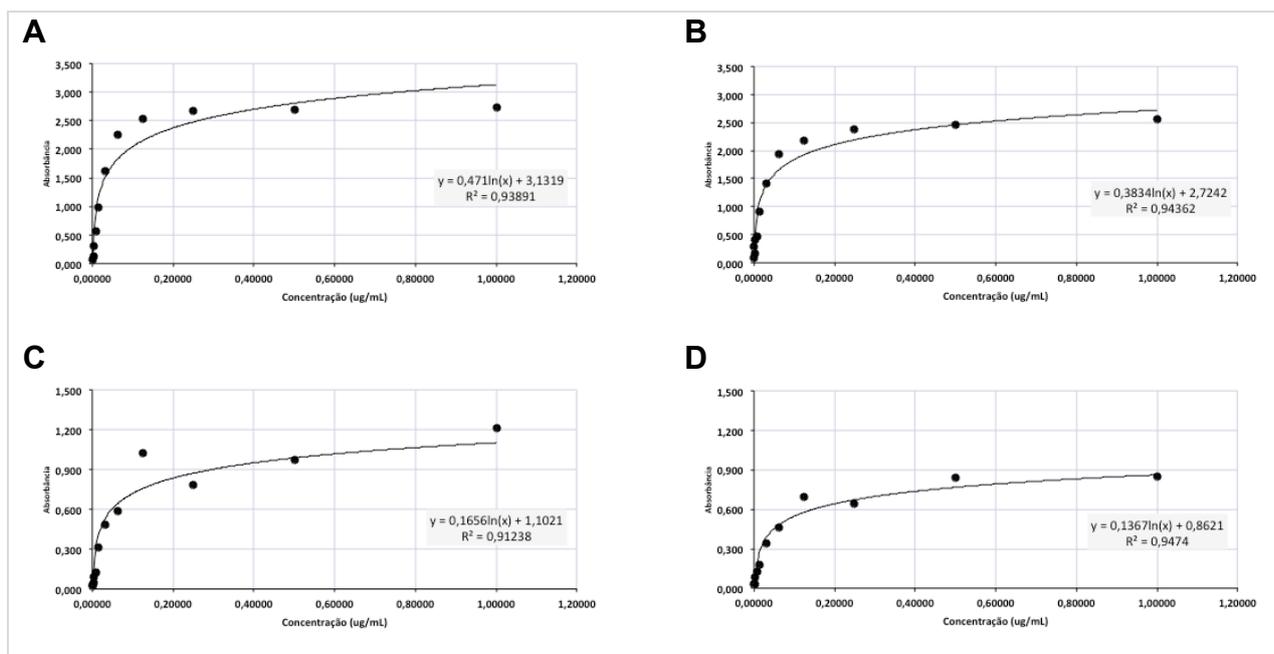


FIGURA 14: Curvas de Calibração Obtidas para ELISA de Autoanticorpos IgG e IgM Anti-LDL(-) com Placas Sensibilizadas com 2 μ g/mL de LDL(-) e Avaliação do Conjugado com Peroxidase (A) título 1/500, (B) título 1/1000, (C) título 1/2000 e (D) título 1/4000.

Anti-LDL(-): autoanticorpos anti-lipoproteína de baixa densidade eletronegativa; ELISA: ensaio imunoenzimático; LDL(-): lipoproteína de baixa densidade eletronegativa

Para a avaliação da presença de autoanticorpos nas amostras, foram utilizados conjugados anti-IgG e anti-IgM humanas. Foram testados os títulos de 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:3000, 1:4000 e 1:5000 para anti-IgG humana conjugada com peroxidase (Abcam). A diluição de 1:3000 foi definida para realização do ELISA anti-LDL(-)-IgG. Também foram testados os títulos de 1:500, 1:1000 e 1:2000 para anti-IgM humana conjugada com peroxidase (Invitrogen™). A diluição de 1:1000 foi definida para realização do ELISA anti-LDL(-)-IgM.

A avaliação das diluições de amostras de plasma recomendadas foi realizada para os ensaios de anti-LDL(-)-IgG e anti-LDL(-)-IgM. Foram verificadas as diluições de 1:11, 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800 de plasma. Para o ELISA anti-LDL(-)-IgG foi definida a diluição de 1:100 e para o ELISA anti-LDL(-)-IgM foi de 1:200.

6.2.2. ELISA PARA IMUNOCOMPLEXOS DE LDL(-)

Para a determinação de IC-LDL(-) foram realizadas avaliações para verificação da padronização proposta anteriormente (FAULIN et al., 2012; FAULIN, 2010).

Primeiramente, foi verificada a concentração de Fab do anticorpo monoclonal MAb2C7D5F10 para a adsorção nas microplacas de ELISA. Foram testadas as concentrações de 2,5; 5 e 10µg/mL, sendo definida a concentração de 10µg/mL para adsorção às microplacas. Também foi realizada a verificação para o título do anticorpo anti-IgG humana Fc específico conjugado com peroxidase, utilizado na etapa de revelação do ELISA para IC-LDL(-), sendo testados os títulos 1:2000, 1:4000 e 1:800. O título do conjugado foi definido na diluição de 1:2000.

As FIGURAS 15 e 16 apresentam as curvas de calibração obtidas nas padronizações realizadas para o ELISA de IC-LDL(-).

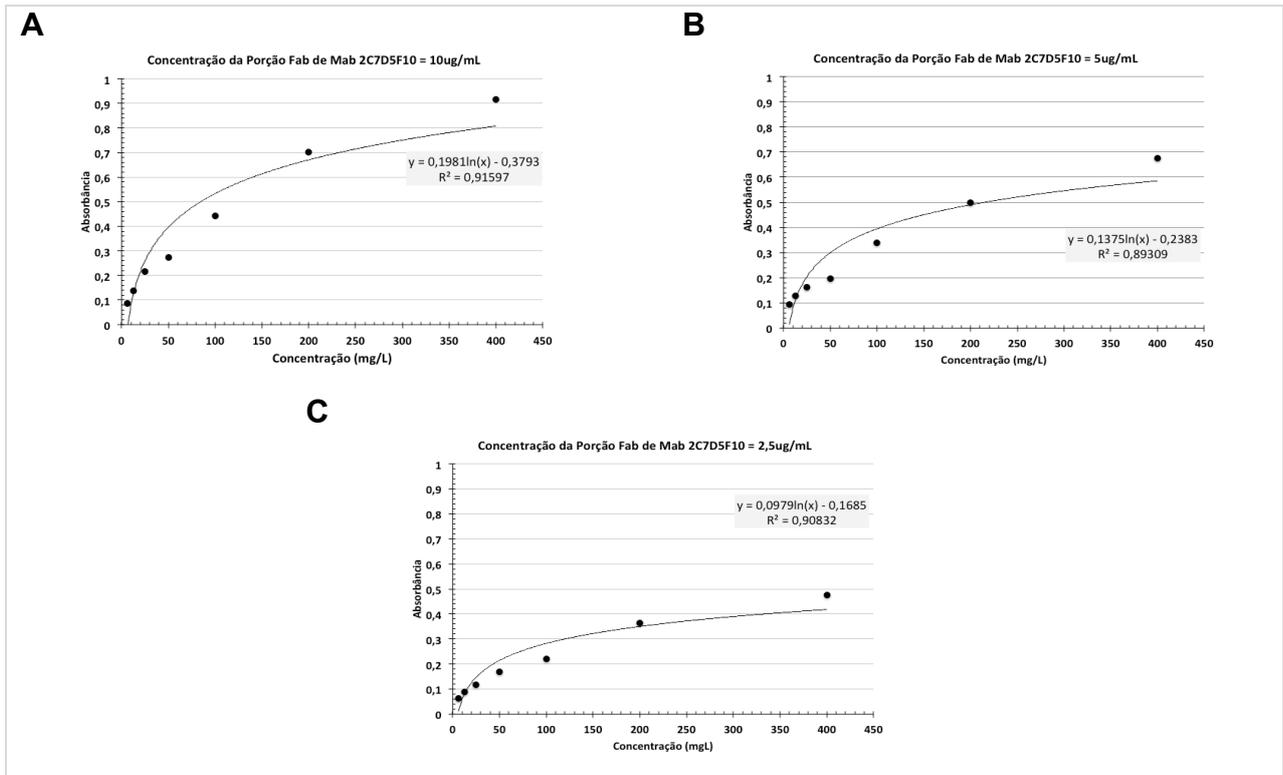


FIGURA 15: Curvas de Calibração Obtidas para ELISA de IC-LDL(-) com Placas Sensibilizadas com Fab do Mab 2C7D5F10 (A) 10µg/mL, (B) 5µg/mL e (C) 2,5µg/mL.

ELISA: ensaio imunoenzimático; **Fab:** fragmento de ligação ao antígeno, porção Fab da molécula de anticorpo; **IC-LDL(-):** imunocomplexos de lipoproteína de baixa densidade eletronegativa; **MAB:** anticorpo monoclonal

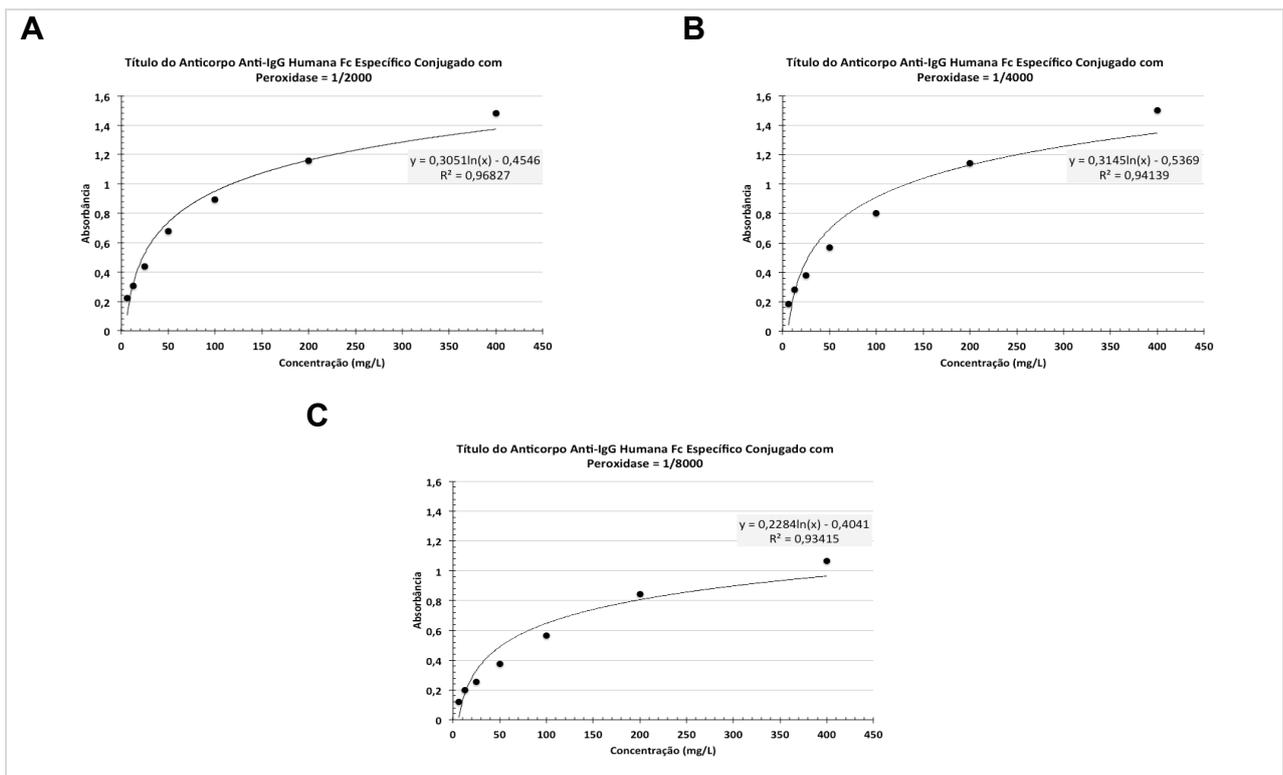


FIGURA 16: Curvas de Calibração Obtidas para ELISA de IC-LDL(-) com Placas Sensibilizadas com 10µg/mL de Fab do Mab 2C7D5F10 e Avaliação do Conjugado com Peroxidase (A) título 1/2000, (B) título 1/4000 e (C) título 1/8000.

ELISA: ensaio imunoenzimático; **Fab:** fragmento de ligação ao antígeno, porção Fab da molécula de anticorpo; **IC-LDL(-):** imunocomplexos de lipoproteína de baixa densidade eletronegativa; **MAB:** anticorpo monoclonal

6.3. DETERMINAÇÃO DOS BIOMARCADORES DE RISCO CARDIOVASCULAR EMERGENTES E NÃO TRADICIONAIS

No presente estudo foram realizadas as determinações de biomarcadores emergentes de risco cardiovascular (TABELA 3) relacionados com modificações das lipoproteínas: LDL(-) e as formas oxidadas de LDL (LDL-oxi, LDL-HNE e LDL-CML); de biomarcadores emergentes relacionados com a resposta imune-inflamatória no processo aterosclerótico: anti-LDL(-)-IgG, anti-LDL(-)-IgM, IC-LDL(-), SAA e MPO; e de biomarcadores não tradicionais relacionados às apolipoproteínas, ApoA-I, ApoB e ApoE em amostras de soro ou plasma de indivíduos com a infecção pelo HIV, tratados ou não com TARV.

TABELA 3: Biomarcadores Emergentes e Não Tradicionais de Risco Cardiovascular em Indivíduos com Infecção pelo HIV, Tratados e Não Tratados com Terapia Antirretroviral.

Biomarcador	Controle (n= 32)	HIV-NT (n= 28)	HIV-TARV (n= 29)
LDL(-) (mg/L)	2217,8 (876,8 - 6533,5)	1432,8 (791,3 - 4876,4)	2264,7 (780,7 - 7157,9)
LDL-oxi (U/L)	46,4 (37,1 - 61,2) ^a	54,9 (42,5 - 69,5) ^{a,b}	67,7 (59,0 - 86,2) ^b
LDL-HNE (mg/L)	1729,1 (1407,5 - 2266,1) ^{c,d}	573,1 (515,5 - 763,9) ^c	567,3 (491,0 - 677,1) ^d
LDL-CML (mg/L)	1440,5 (1238,5 - 1866,6) ^{e,f}	914,6 (140,2 - 1590,3) ^e	772,7 (403,3 - 1434,2) ^f
Anti-LDL(-)-IgG (mg/L)	4,172 (1,856 - 8,071) ^g	17,961 (5,683 - 59,767) ^{g,h}	4,134 (2,354 - 6,656) ^h
Anti-LDL(-)-IgM (mg/L)	3,165 (1,707 - 6,810)	2,623 (1,631 - 8,007)	1,705 (1,154 - 3,362)
IC-LDL(-) (mg/L)	2750,0 (1971,4 - 3848,9)	2239,0 (1908,1 - 3230,9)	1991,9 (1601,9 - 2966,0)
SAA (mg/L)	126,0 (86,3 - 137,4)	129,9 (108,5 - 143,5)	141,1 (111,6 - 156,6)
MPO (mg/L)	0,200 (0,134 - 0,312) ⁱ	0,112 (0,089 - 0,142) ^j	0,115 (0,088 - 0,141) ^{i,j}
ApoA-I (mg/L)	968,3 (705,9 - 1133,8)	970,0 (717,9 - 1277,8)	1102,0 (791,8 - 1315,0)
ApoB (mg/L)	674,2 (553,2 - 854,2)	649,3 (568,0 - 843,9)	652,2 (566,3 - 857,1)
ApoE (mg/L)	48,2 (36,1 - 52,3)	40,3 (28,7 - 52,3)	48,2 (36,1 - 64,6)

Resultados apresentados como mediana (intervalo interquartilico). O p-valor foi determinado pelo teste de Kruskal Wallis com pós-teste SLD de Fisher, com as diferenças entre grupos sinalizadas para valores de p significantes (p<0,05).

^a grupo controle ≠ grupo HIV-NT; ^b grupo HIV-NT ≠ grupo HIV-TARV; ^c grupo controle ≠ grupo HIV-NT; ^d grupo controle ≠ grupo HIV-TARV; ^e grupo controle ≠ grupo HIV-NT; ^f grupo controle ≠ grupo HIV-TARV; ^g grupo controle ≠ grupo HIV-NT; ^h grupo HIV-NT ≠ grupo HIV-TARV; ⁱ grupo controle ≠ grupo HIV-TARV; ^j grupo HIV-NT ≠ grupo HIV-TARV

#: diferente; **Anti-LDL(-)-IgG:** autoanticorpos IgG anti-lipoproteína de baixa densidade eletronegativa; **Anti-LDL(-)-IgM:** autoanticorpos IgM anti-lipoproteína de baixa densidade eletronegativa; **ApoA-I:** apolipoproteína A-I; **ApoB:** apolipoproteína B; **ApoE:** apolipoproteína E; **Controle:** indivíduos sem infecção pelo HIV; **HIV-NT:** indivíduos com infecção pelo HIV não tratados com terapia antirretroviral; **HIV-TARV:** indivíduos com infecção pelo HIV tratados com terapia antirretroviral; **HIV:** vírus da imunodeficiência humana; **IC-LDL(-):** imunocomplexos de lipoproteína de baixa densidade eletronegativa; **LDL(-):** lipoproteína de baixa densidade eletronegativa; **LDL-CML:** lipoproteína de baixa densidade oxidada modificada por carboximetila; **LDL-HNE:** lipoproteína de baixa densidade oxidada modificada por 4-hidroxi nonenal; **LDL-oxi:** lipoproteína de baixa densidade oxidada modificada por malondialdeído; **MPO:** mieloperoxidase; **SAA:** proteína amiloide sérica A

A FIGURA 17 apresenta a distribuição das concentrações de LDL(-), de IC-LDL(-) e de autoanticorpos anti-LDL(-)-IgG e anti-LDL(-)-IgM para os grupos controle, HIV-NT e HIV-TARV.

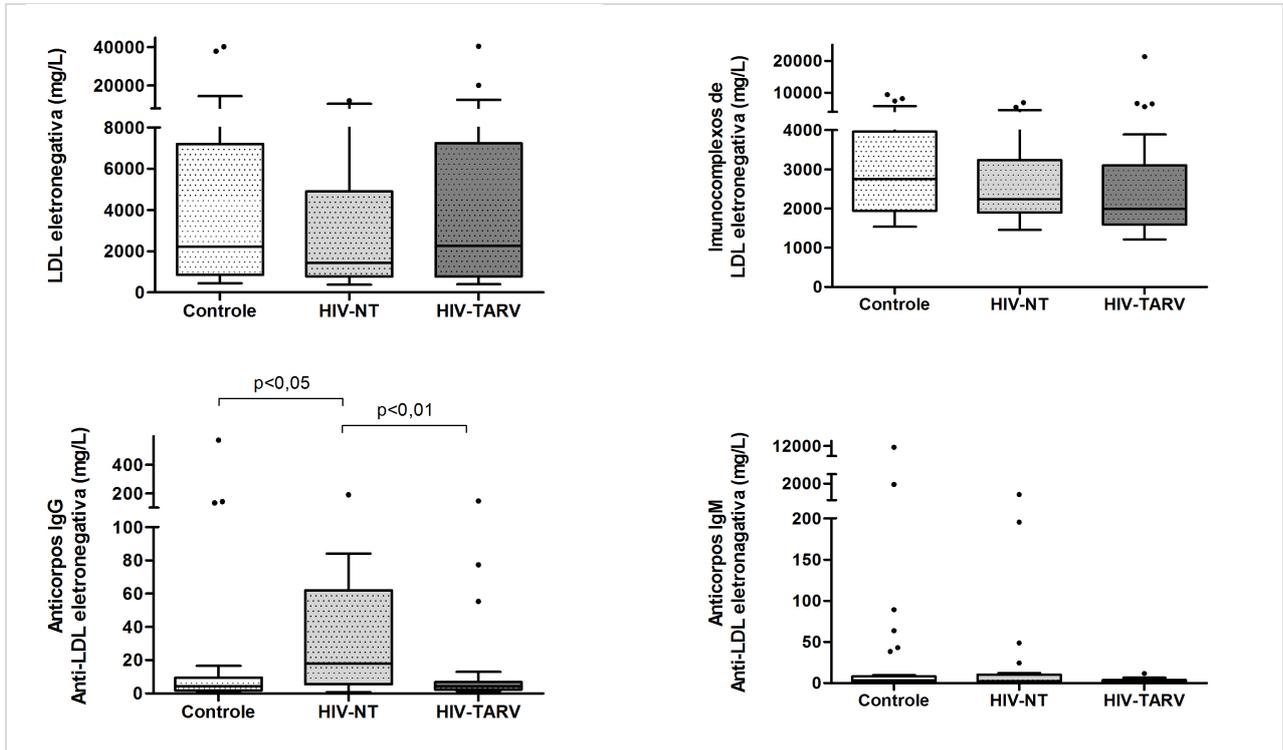


FIGURA 17: Distribuição das Concentrações de LDL(-), IC-LDL(-), Anticorpos Anti-LDL(-)-IgG e Anti-LDL(-)-IgM (mg/L) para Grupos Controle (n= 32), HIV-NT (n= 28) e HIV-TARV (n= 29). Dados apresentados como mediana e intervalo interquartilico, incluindo valores extremos (pontos). Os valores de p foram determinados pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste LSD de Fisher (ANOVA para ordens).

ANOVA: análise de variância; **Anti-LDL(-)-IgG:** autoanticorpos IgG anti-lipoproteína de baixa densidade eletronegativa; **Anti-LDL(-)-IgM:** autoanticorpos IgM anti-lipoproteína de baixa densidade eletronegativa; **Controle:** indivíduos sem infecção pelo HIV; **HIV-NT:** indivíduos com infecção pelo HIV não tratados com terapia antirretroviral; **HIV-TARV:** indivíduos com infecção pelo HIV tratados com terapia antirretroviral; **HIV:** vírus da imunodeficiência humana; **IC-LDL(-):** imunocomplexos de lipoproteína de baixa densidade eletronegativa; **LDL(-):** lipoproteína de baixa densidade eletronegativa; **LSD:** menor diferença significativa

Não foram identificadas diferenças para as concentrações de LDL(-) entre os grupos controle, HIV-NT e HIV-TARV, apesar do grupo HIV-NT apresentar tendência para valores mais baixos que os demais, essa diferença não foi estatisticamente significativa. Também não foram identificadas diferenças para as concentrações de IC-LDL(-) e anti-LDL(-)-IgM entre os grupos controle, HIV-NT e HIV-TARV. Apesar das diferenças gráficas entre os grupos e dos pontos extremos, não ocorreram diferenças estatisticamente significantes, mesmo considerando a comparação entre ordens (ANOVA, comparação múltipla de médias das ordens), que elimina a influência dos valores extremos. Foram identificadas diferenças para anti-LDL(-)-IgG entre os grupos controle e HIV-NT ($p < 0,05$; Kruskal Wallis e pós-teste LSD

de Fisher) e entre os grupos HIV-NT e HIV-TARV ($p < 0,01$; Kruskal Wallis e pós-teste LSD de Fisher). O grupo HIV-NT apresentou concentrações aumentadas de anticorpos anti-LDL(-)-IgG quando comparado aos grupos controle e HIV-TARV. A comparação dos grupos HIV-NT e HIV-TARV demonstrou que o TARV promoveu diminuição das concentrações dos anticorpos anti-LDL(-)-IgG.

A FIGURA 18 apresenta a distribuição das concentrações de LDL-oxi, LDL-HNE e LDL-CML para os grupos controle, HIV-NT e HIV-TARV.

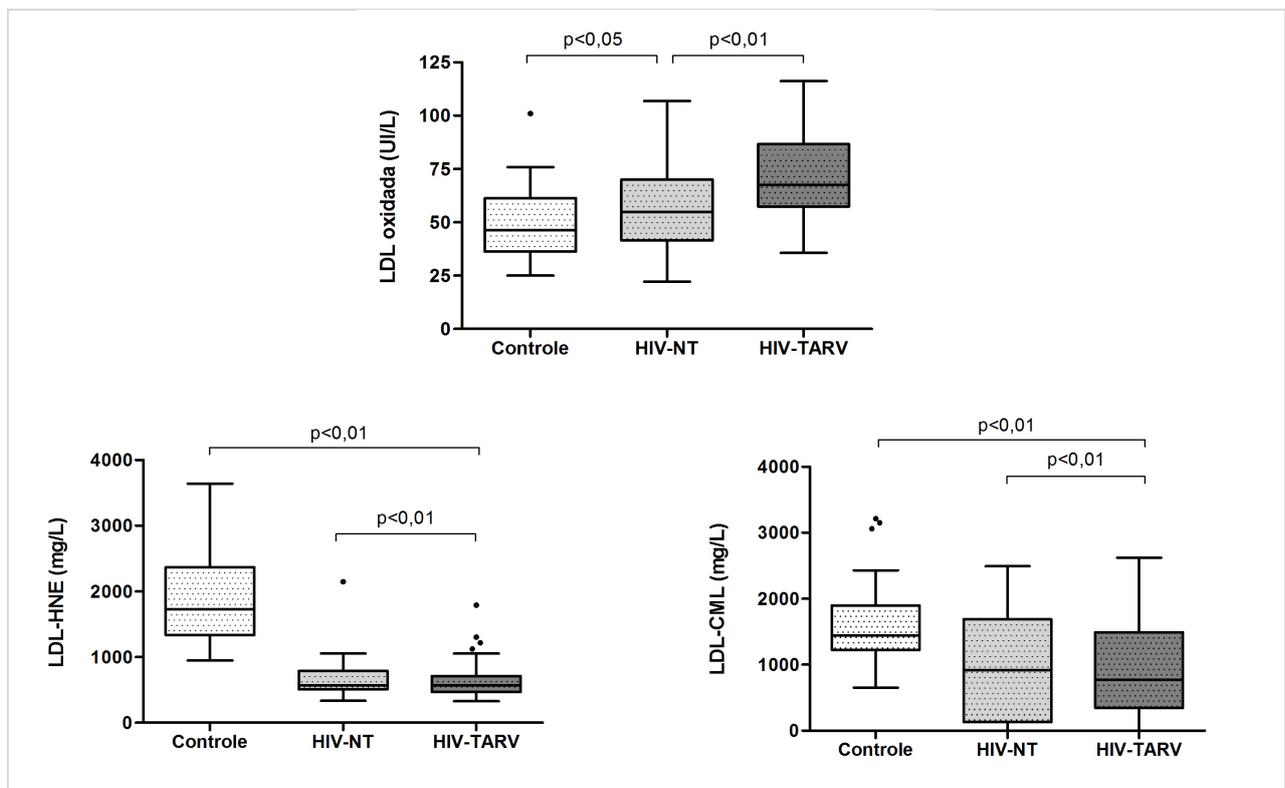


FIGURA 18: Distribuição das Concentrações de LDL-oxidada (UI/L), LDL-HNE e LDL-CML (mg/L) para Grupos Controle (n= 32), HIV-NT (n= 28) e HIV-TARV (n= 29). Dados apresentados como mediana e intervalo interquartilico, incluindo valores extremos (pontos). Os valores de p foram determinados pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste LSD de Fisher (ANOVA para ordens).

ANOVA: análise de variância; **Controle:** indivíduos sem infecção pelo HIV; **HIV-NT:** indivíduos com infecção pelo HIV não tratados com terapia antirretroviral; **HIV-TARV:** indivíduos com infecção pelo HIV tratados com terapia antirretroviral; **HIV:** vírus da imunodeficiência humana; **LDL-CML:** lipoproteína de baixa densidade oxidada modificada por carboximetila; **LDL-HNE:** lipoproteína de baixa densidade oxidada modificada por 4-hidroxinonenal; **LSD:** menor diferença significante

Foram identificadas diferenças para as concentrações de LDL-oxi entre os grupos controle e HIV-NT ($p < 0,05$; Kruskal Wallis e pós-teste LSD de Fisher) e entre os grupo HIV-NT e HIV-TARV ($p < 0,01$; Kruskal Wallis e pós-teste LSD de Fisher). A comparação dos grupos HIV-NT e HIV-TARV demonstrou que o TARV aumentou os níveis de LDL-oxi. Também foram identificadas diferenças entre grupos para as concentrações de LDL-HNE e LDL-CML entre os grupos controle e HIV-NT ($p < 0,01$;

Kruskal Wallis e pós-teste LSD de Fisher) e entre os grupos controle e HIV-TARV ($p < 0,01$; Kruskal Wallis e pós-teste LSD de Fisher). Tanto LDL-HNE como LDL-CML apresentaram tendência para concentrações menores no grupo HIV-NT em comparação com o grupo controle, que não foram estatisticamente significantes e apresentaram o mesmo comportamento. O grupo HIV-TARV apresentou aumento das concentrações de LDL-oxi e diminuição dos níveis de LDL-HNE e LDL-CML em relação ao grupo controle.

A FIGURA 19 apresenta a distribuição das concentrações de MPO e de SAA para os grupos controle, HIV-NT e HIV-TARV. Não foram identificadas diferenças para as concentrações de SAA entre os grupos controle, HIV-NT e HIV-TARV. Foram identificadas diferenças para MPO entre os grupos controle e HIV-TARV ($p < 0,01$; Kruskal Wallis e pós-teste LSD de Fisher) e entre os grupos HIV-NT e HIV-TARV ($p < 0,01$; Kruskal Wallis e pós-teste LSD de Fisher). Observou-se nos grupos HIV-NT e HIV-TARV valores diminuídos para as concentrações de MPO em comparação ao grupo controle.

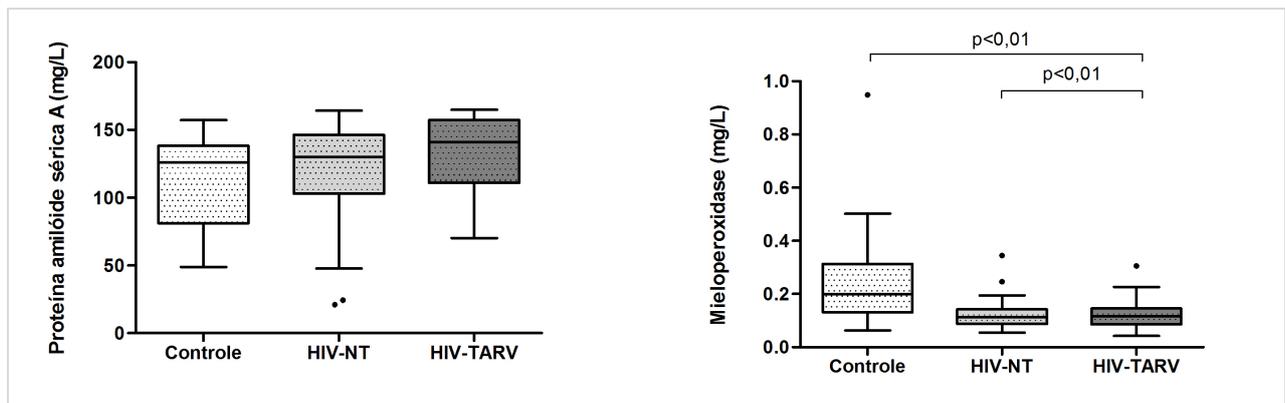


FIGURA 19: Distribuição das Concentrações de SAA e MPO (mg/L) para Grupos Controle (n= 32), HIV-NT (n= 28) e HIV-TARV (n= 29). Dados apresentados como mediana e intervalo interquartilico, incluindo valores extremos (pontos). Os valores de p foram determinados pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste LSD de Fisher (ANOVA para ordens).

ANOVA: análise de variância; **Controle:** indivíduos sem infecção pelo HIV; **HIV-NT:** indivíduos com infecção pelo HIV não tratados com terapia antirretroviral; **HIV-TARV:** indivíduos com infecção pelo HIV tratados com terapia antirretroviral; **HIV:** vírus da imunodeficiência humana; **LSD:** menor diferença significativa; **MPO:** mieloperoxidase; **SAA:** proteína amiloide sérica A

A FIGURA 20 apresenta a distribuição das concentrações de ApoA-I, de ApoB e de ApoE para os grupos controle, HIV-NT e HIV-TARV, que não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos estudados.

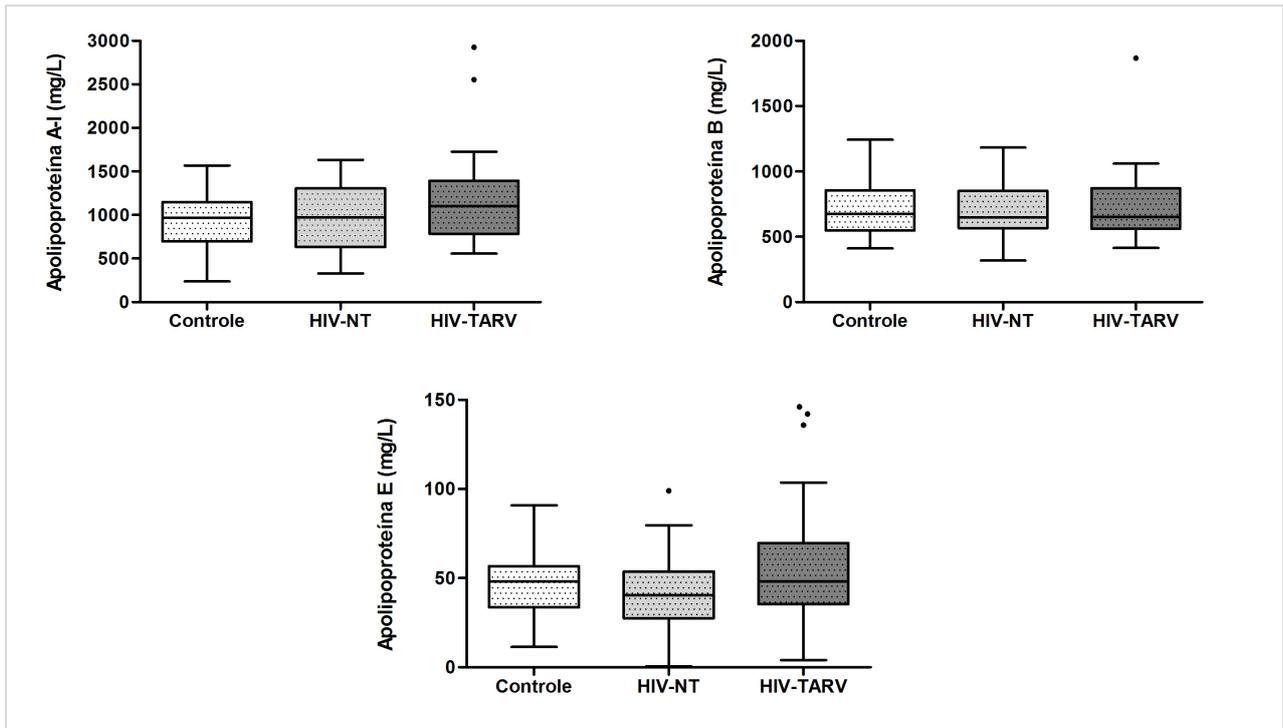


FIGURA 20: Distribuição das Concentrações de ApoA-I, ApoB e ApoE (mg/L) para Grupos Controle (n= 32), HIV-NT (n= 28) e HIV-TARV (n=29). Dados apresentados como mediana e intervalo interquartílico, incluindo valores extremos (pontos). Os valores de p foram determinados pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste LSD de Fisher (ANOVA para ordens).

ANOVA: análise de variância; **ApoA-I:** apolipoproteína A-I; **ApoB:** apolipoproteína B; **ApoE:** apolipoproteína E; **Controle:** indivíduos sem infecção pelo HIV; **HIV-NT:** indivíduos com infecção pelo HIV não tratados com terapia antirretroviral; **HIV-TARV:** indivíduos com infecção pelo HIV tratados com terapia antirretroviral; **HIV:** vírus da imunodeficiência humana; **LSD:** menor diferença significante

Também foram analisadas as associações entre os biomarcadores estudados, sendo verificada correlação inversa entre as concentrações de LDL(-) e IC-LDL(-) ($rs = -0,214$, Spearman, $p < 0,05$), representada graficamente pela FIGURA 21.

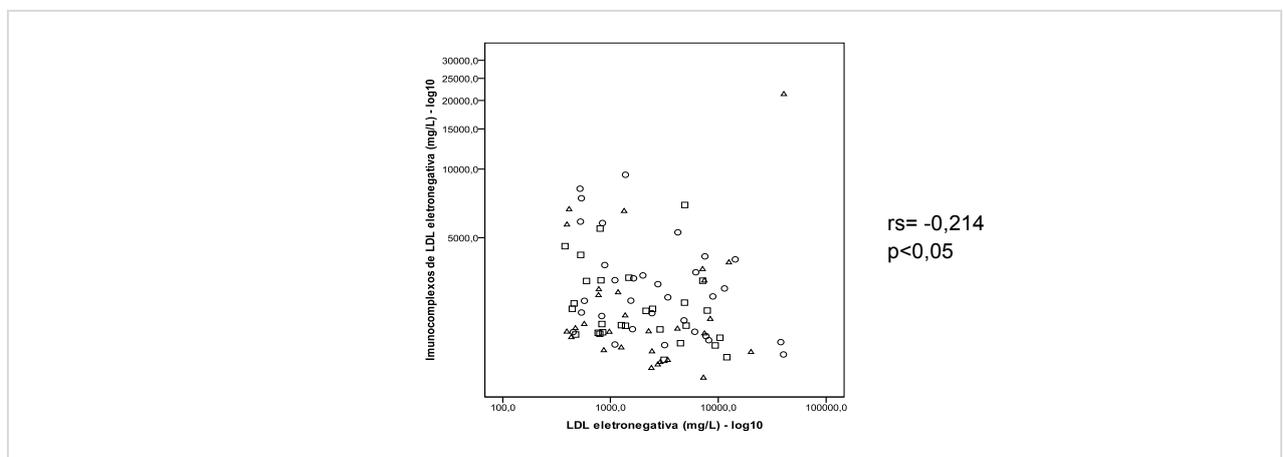


FIGURA 21: Dispersão da Correlação entre Concentrações de LDL(-) e IC-LDL(-) (mg/L em escala \log_{10}). Pontos representado os grupos controle (círculo vazio), HIV-NT (quadrado vazio) e HIV-TARV (triângulo vazio). O valor de p foi determinado pelo teste de correlação de Spearman.

Controle: indivíduos sem infecção pelo HIV; **HIV-NT:** indivíduos com infecção pelo HIV não tratados com terapia antirretroviral; **HIV-TARV:** indivíduos com infecção pelo HIV tratados com terapia antirretroviral; **HIV:** vírus da imunodeficiência humana; **IC-LDL(-):** imunocomplexos de lipoproteína de baixa densidade eletronegativa; **LDL(-):** lipoproteína de baixa densidade eletronegativa; **rs:** coeficiente de correlação de Spearman

As concentrações de LDL-CML correlacionaram-se positivamente com LDL(-), LDL-oxi, LDL-HNE e IC-LDL(-) ($rs = 0,212$, Spearman, $p < 0,05$; $rs = 0,214$, Spearman, $p < 0,05$; $rs = 0,573$, Spearman, $p < 0,01$ e $rs = 0,219$, Spearman, $p < 0,05$), conforme representado pela FIGURA 22 (A, B, C e D).

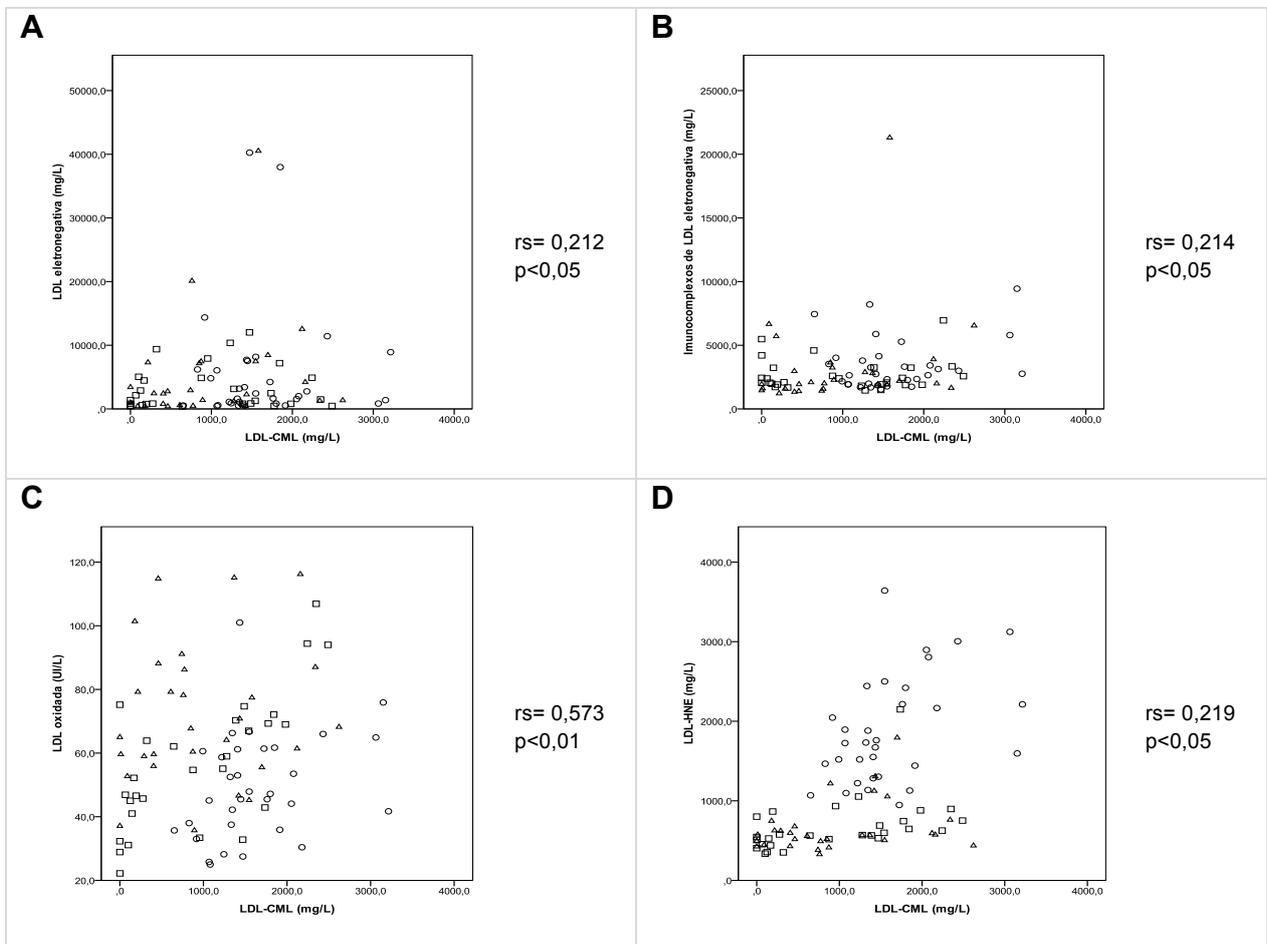


FIGURA 22: Dispersão das Correlações entre Concentrações de LDL-CML (mg/L) e Biomarcadores (A) LDL(-) (mg/L), (B) IC-LDL(-) (mg/L), (C) LDL-oxi (UI/L) e (D) LDL-HNE (mg/L). Pontos representado os grupos controle (círculo vazio), HIV-NT (quadrado vazio) e HIV-TARV (triângulo vazio). O valor de p foi determinado pelo teste de correlação de Spearman.

Controle: indivíduos sem infecção pelo HIV; **HIV-NT:** indivíduos com infecção pelo HIV não tratados com terapia antirretroviral; **HIV-TARV:** indivíduos com infecção pelo HIV tratados com terapia antirretroviral; **HIV:** vírus da imunodeficiência humana; **IC-LDL(-):** imunocomplexos de lipoproteína de baixa densidade eletronegativa; **LDL-CML:** lipoproteína de baixa densidade oxidada modificada por carboximetila; **LDL-HNE:** lipoproteína de baixa densidade oxidada modificada por 4-hidroxinonenal; **LDL-oxi:** lipoproteína de baixa densidade oxidada com modificada por malondialdeído; **LDL(-):** lipoproteína de baixa densidade eletronegativa; **rs:** coeficiente de correlação de Spearman

Os autoanticorpos anti-LDL(-)-IgG correlacionaram-se positivamente com IC-LDL(-) e autoanticorpos anti-LDL(-)-IgM ($rs = 0,240$, Spearman, $p < 0,05$ e $rs = 0,348$, Spearman, $p < 0,01$), sendo representados pela FIGURA 23 (A e B).

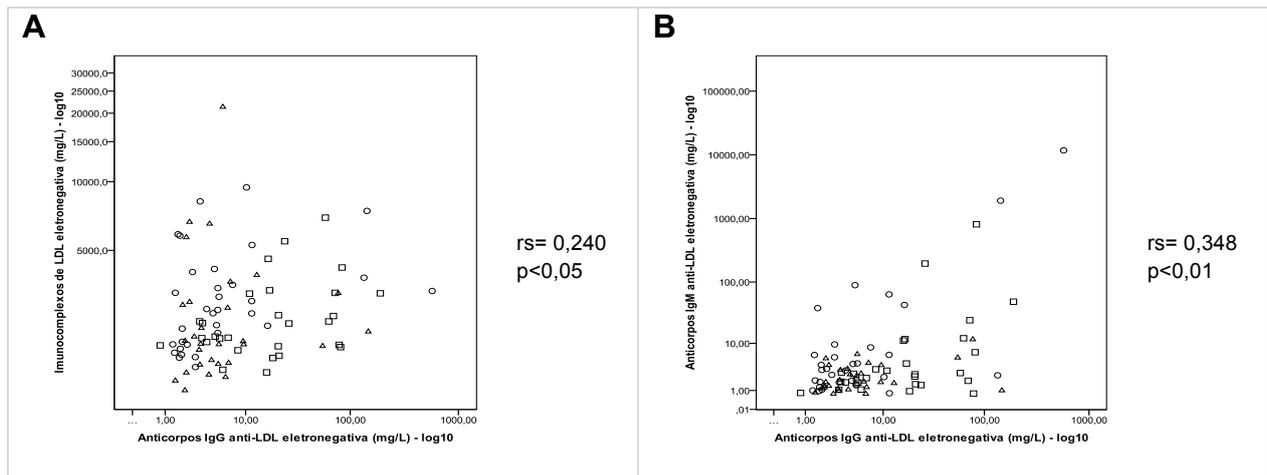


FIGURA 23: Dispersão das Correlações entre Concentrações de Anticorpos Anti-LDL(-)-IgG (mg/L em escala log₁₀) e (A) IC-LDL(-) (mg/L em escala log₁₀) e (B) Anticorpos Anti-LDL(-)-IgM (mg/L em escala log₁₀). Pontos representado os grupos controle (círculo vazio), HIV-NT (quadrado vazio) e HIV-TARV (triângulo vazio). O valor de p foi determinado pelo teste de correlação de Spearman.

Anti-LDL(-)-IgG: autoanticorpos IgG anti-lipoproteína de baixa densidade eletronegativa; **Anti-LDL(-)-IgM:** autoanticorpos IgM anti-lipoproteína de baixa densidade eletronegativa; **Controle:** indivíduos sem infecção pelo HIV; **HIV-NT:** indivíduos com infecção pelo HIV não tratados com terapia antirretroviral; **HIV-TARV:** indivíduos com infecção pelo HIV tratados com terapia antirretroviral; **HIV:** vírus da imunodeficiência humana; **IC-LDL(-):** imunocomplexos de lipoproteína de baixa densidade eletronegativa; **rs:** coeficiente de correlação de Spearman

As concentrações de SAA correlacionaram-se com ApoE (rs= 0,289, Spearman, p<0,01), essa relação não foi apresentada graficamente.

As concentrações de ApoA-I correlacionaram-se positivamente com ApoB e ApoE (rs= 0,418 e rs= 0,347, Spearman, p<0,01). As concentrações de ApoB também correlacionaram-se positivamente com as concentrações de ApoE (rs= 0,286, Spearman, p<0,01), conforme representado pela FIGURA 24 (A, B e C).

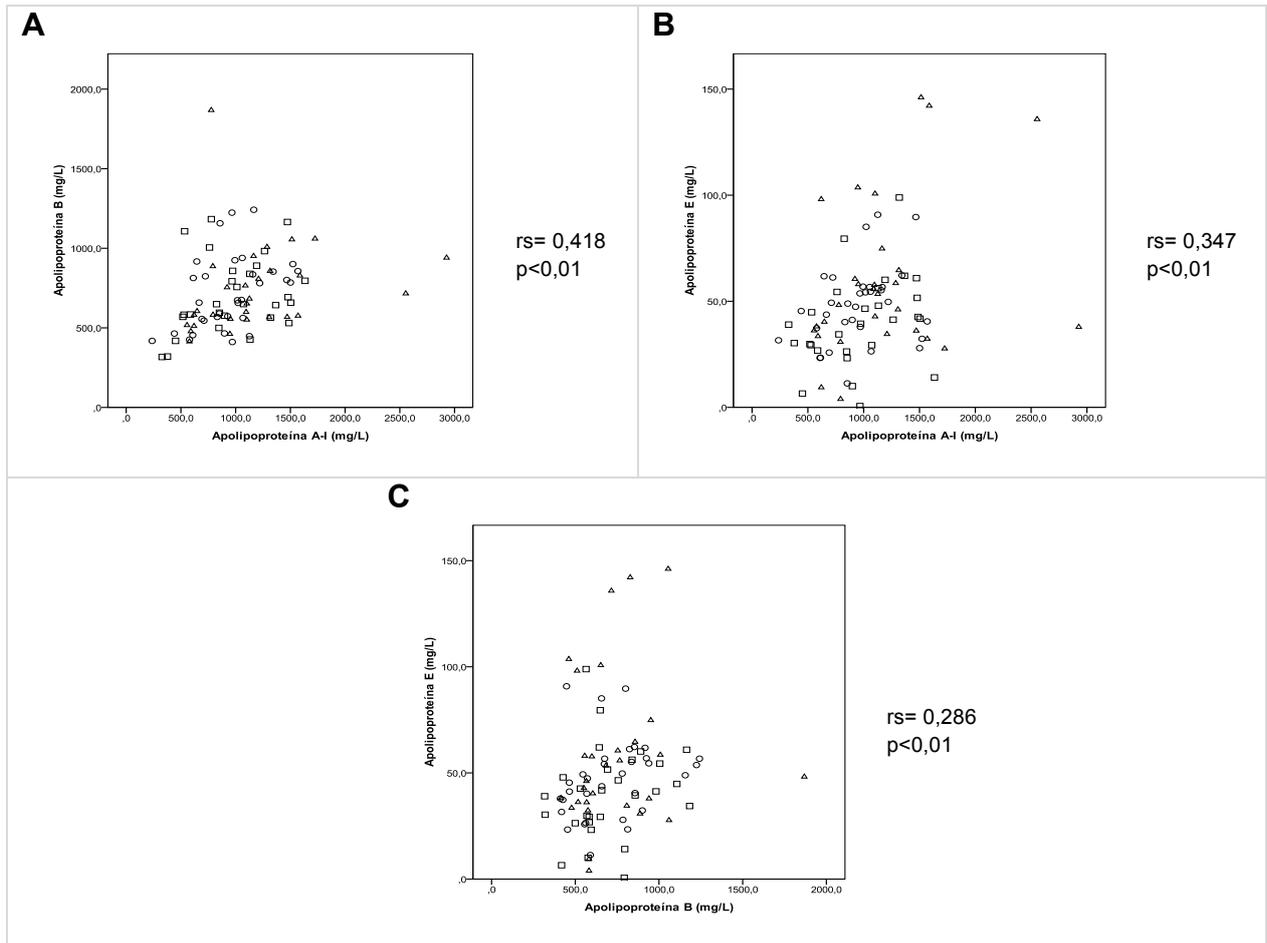


FIGURA 24: Dispersão das Correlações entre Concentrações de ApoA-I (mg/L) e **(A)** ApoB (mg/L) e **(B)** ApoE (mg/L) e entre Concentrações de **(C)** ApoB e ApoE (mg/L). Pontos representado os grupos controle (círculo vazio), HIV-NT (quadrado vazio) e HIV-TARV (triângulo vazio). O valor de p foi determinado pelo teste de correlação de Spearman.

ApoA-I: apolipoproteína A-I; **ApoB:** apolipoproteína B; **ApoE:** apolipoproteína E; **Controle:** indivíduos sem infecção pelo HIV; **HIV-NT:** indivíduos com infecção pelo HIV não tratados com terapia antirretroviral; **HIV-TARV:** indivíduos com infecção pelo HIV tratados com terapia antirretroviral; **HIV:** vírus da imunodeficiência humana; **rs:** coeficiente de correlação de Spearman

Além disso, as concentrações de IC-LDL(-) também correlacionaram-se positivamente com LDL-HNE ($rs = 0,209$, Spearman, $p < 0,05$). As concentrações de LDL-oxi apresentaram correlação inversa com os autoanticorpos anti-LDL(-)-IgM, com baixa significância estatística ($rs = -0,205$, Spearman, $p = 0,05$). Os gráficos para essas avaliações não foram apresentados.

Foram realizadas avaliações de correlação entre os biomarcadores deste estudo e os marcadores determinados no momento da coleta das amostras, onde verificou-se correlação entre SAA e PCR ($rs = 0,467$, Spearman, $p < 0,01$). As concentrações de LDL-colesterol correlacionaram-se com LDL-oxi e com LDL-CML ($rs = 0,654$ e $rs = 0,304$, Spearman, $p < 0,01$), assim como, com as concentrações de ApoA-I, ApoB e ApoE ($rs = 0,368$, $rs = 0,781$ e $rs = 0,314$, Spearman, $p < 0,01$). As concentrações

de HDL-colesterol correlacionaram-se positivamente com ApoB ($r_s = 0,208$, Spearman, $p = 0,05$) e com autoanticorpos anti-LDL(-)-IgM ($r_s = 0,284$, Spearman, $p < 0,01$). Verificou-se também que as determinações de LDL(-) realizadas no momento da coleta das amostras apresentaram correlação significativa com as concentrações de LDL(-) realizadas neste estudo ($r_s = 0,922$, Spearman, $p < 0,01$), demonstrando a estabilidade dos materiais.

A avaliação das correlações dos biomarcadores com carga viral e células CD4 entre os grupos HIV-NT e HIV-TARV demonstrou que as concentrações de ApoE e LDL-oxi apresentaram correlação inversa com a carga viral ($r_s = -0,261$, Spearman, $p = 0,05$ e $r_s = -0,360$, Spearman, $p < 0,01$). Entretanto, as concentrações de autoanticorpos anti-LDL(-)-IgG apresentaram correlação com a carga viral ($r_s = 0,311$, Spearman, $p < 0,05$). Não foram identificadas correlações entre os demais biomarcadores e a carga viral. Também não foram identificadas correlações dos biomarcadores estudados com as determinações de células CD4 entre os grupos HIV-NT e HIV-TARV.

7.DISSCUSSÃO

Pacientes com infecção pelo HIV apresentam risco de DCV aumentado devido à infecção propriamente dita e devido a outros fatores como alterações metabólicas associadas à TARV, estilo de vida ou coexistência de infecções crônicas (BELTRÁN et al., 2015). Neste estudo investigou-se biomarcadores de risco cardiovascular tradicionais, não tradicionais e emergentes, incluindo a presença de partículas modificadas de LDL em indivíduos com a infecção pelo HIV em comparação com indivíduos saudáveis sem infecção.

As metodologias utilizadas para determinação de LDL(-) em vários estudos estão baseadas em sistemas de cromatografia de troca iônica, cujos resultados são reportados em porcentagem de LDL(-) contida no soro em relação à concentração de LDL total (NICCOLLI et al., 2012). Algumas diferenças observadas entre os estudos da LDL(-) podem ser atribuídas às diferentes origens dos reagentes utilizados, uma vez que os pesquisadores utilizam metodologias como FPLC (cromatografia líquida rápida de proteínas), HPLC (cromatografia líquida de alto desempenho) e ELISA. Este estudo utilizou ensaios imunoenzimáticos com anticorpos específicos para formas modificadas de LDL, podendo caracterizar e diferenciar as partículas envolvidas no processo de formação da aterosclerose. O uso dos anticorpos para quantificação da LDL(-) demonstraram níveis aumentados deste biomarcador de modificação lipoproteica em pacientes com síndrome coronariana aguda, como angina instável e estável (OLIVEIRA et al., 2006) e também em pacientes submetidos à hemodiálise (LOBO et al., 2008). Entretanto, alguns trabalhos discutem se essas abordagens e suas conclusões poderiam ser verificadas pelas técnicas utilizadas atualmente para a determinação de LDL(-), como a cromatografia de troca iônica (KE et al., 2014). A comparação das metodologias utilizadas para determinação de LDL(-) e da fração eletroforética L5, que apresenta maior proporção de carga negativa, demonstraram que as diferenças observadas na relação entre LDL(-) e LDL total ou entre as subfrações L5 e L1 podem ser resultado das variações entre os diferentes métodos utilizados para a separação cromatográfica, uma vez que os intervalos de separação da LDL podem ser diferentes entre as técnicas utilizadas (KE et al, 2014).

Assim, sabendo-se que as modificações endógenas das partículas de LDL podem apresentar grande potencial como biomarcadores de risco cardiovascular e, de certa forma, como alvo terapêutico na prevenção de DCV, sugere-se que os

estudos realizados devem considerar o estabelecimento de método padrão para a determinação de LDL(-), facilitando sua aplicação em avaliações populacionais e na identificação de estratégias para eliminação destas partículas no sangue (KE et al., 2014). O presente estudo utilizou teste ELISA padronizado com anticorpo específico para a identificação de LDL(-), bem como para identificação de autoanticorpos e imunocomplexos. As vantagens da utilização de anticorpos monoclonais específicos para a partícula de LDL(-) incluem sua detecção direta no plasma, dispensando isolamento prévio, alta sensibilidade e especificidade, uso de pequenos volumes e possibilidade de realização de várias análises concomitantes, permitindo estudos clínicos e epidemiológicos (DAMASCENO et al., 2006).

A LDL(-) encontrada no plasma humano é considerada altamente aterogênica e sua concentração está aumentada em indivíduos com risco cardiovascular. Seu aumento tem sido demonstrado em várias doenças (KE et al., 2014) e sua presença foi detectada em lesões ateroscleróticas de humanos e coelhos (DAMASCENO et al., 2006). Niccoli e colaboradores (2012) mostraram que a LDL(-) foi associada com a gravidade da DCV, mas essa associação não foi observada com a LDL nativa, demonstrando que o papel aterogênico da LDL pode ser mediado preferencialmente por suas subfrações modificadas (NICCOLI et al., 2012). Concentração aumentada da LDL(-) tem sido observada em pacientes com risco aumentado de DCV, como a hipercolesterolemia familiar, hipertriglicidemia, diabetes tipo 1 e 2 e em pacientes submetidos à hemodiálise (MELLO et al., 2011). Sabe-se que a resposta autoimune estimula as modificações da LDL, bem como a produção de anticorpos contra essas partículas modificadas e a formação de imunocomplexos, eventos importantes no processo da aterosclerose (MIRONOVA et al., 2000).

No entanto, no presente estudo não foram identificadas alterações para as concentrações de LDL(-) entre os indivíduos com infecção pelo HIV, tratados e não tratados com TARV. Um dos fatores que poderia alterar a concentração plasmática de LDL(-) e contribuir para esse resultado seria a formação de imunocomplexos, uma vez que haveria diminuição do antígeno livre, ou seja, de LDL(-) detectado pelo ELISA. Apesar de ter sido observada uma correlação inversa entre as concentrações de LDL(-) e IC-LDL(-) ($r_s = -0,214$, Spearman, $p < 0,05$) não se constatou diferenças significativas para os imunocomplexos IC-LDL(-) entre os grupos estudados. Uma interferência possível para os ensaios de detecção de anticorpos contra as formas modificadas de LDL é a baixa avidéz destes anticorpos. Estudos demonstraram que os anticorpos

complexados apresentam maior avidéz do que anticorpos livres circulantes. Também foi reportada correlação inversa entre as concentrações circulantes de IC-LDL e as concentrações séricas de anticorpos contra LDL-oxi, demonstrando que, na presença de IC-LDL solúveis, os ensaios para anticorpos contra a forma oxidada da LDL poderiam subestimar a concentração total de anticorpos na circulação (LOPES-VIRELLA; VIRELLA, 2013; VIRELLA; LOPES-VIRELLA, 2003).

As modificações oxidativas das partículas de LDL são reconhecidas como importantes no processo da aterosclerose e o aumento das concentrações de LDL-oxi foi associado com obesidade abdominal e síndrome metabólica (DUONG et al., 2006). Duong e colaboradores demonstraram que indivíduos com infecção pelo HIV que desenvolveram lipodistrofia durante a TARV apresentaram baixa expressão de receptores de LDL e aumento das concentrações de plasmáticas de LDL-oxi (DUONG et al., 2006). Entre os marcadores de peroxidação lipídica associados à LDL, a LDL-oxi aumentou nos grupos HIV-NT e HIV-TARV em relação ao controle. Em contraste, a LDL-HNE e a LDL-CML diminuíram nos grupos HIV-NT e HIV-TARV em relação ao controle, sugerindo que a infecção viral afeta distintamente as diferentes etapas de modificação oxidativa da LDL, podendo haver predominância da formação de malondialdeído (MDA), que origina o epítipo MDA-lisina reconhecido pelo anticorpo utilizado no imunoenensaio para detecção de LDL-oxi. Durante a oxidação da LDL, a ApoB100 degrada-se em vários epítipos que podem se ligar covalentemente com aldeídos como o MDA, cujas modificações resultam em estruturas reconhecidas pelo sistema imune como novos antígenos (NILSSON, et al., 2007).

Sabe-se hoje que a inflamação está intimamente associada com o processo da aterosclerose, não apenas pelo acúmulo de lipídeos pró-inflamatórios e potencialmente citotóxicos, mas também pela complexa rede das respostas imune inata e adaptativa. Este fato sugere que o sistema imune poderia ser alvo para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para prevenção e tratamento da DCV. Interessantemente, a LDL continua sendo uma partícula amplamente estudada no processo aterogênico sob vários aspectos ao longo dos últimos anos. A oxidação da LDL produz vários mediadores pró-inflamatórios e a LDL modificada é alvo das respostas imune inata e adaptativa (NILSSON et al., 2007).

Em relação aos biomarcadores relacionados à resposta imune-inflamatória aqui estudados, não foram identificadas diferenças para as concentrações de IC-LDL(-), anti-LDL(-)-IgM e SAA entre os indivíduos com infecção pelo HIV,

tratados e não tratados com TARV, quando comparados com indivíduos sem infecção. Embora não tenham sido observadas diferenças entre os grupos estudados para os níveis de IC-LDL(-) e anti-LDL(-)-IgM, observou-se correlação positiva das concentrações de anti-LDL(-)-IgG com esses biomarcadores ($r_s = 0,240$, Spearman, $p < 0,05$ e $r_s = 0,348$, Spearman, $p < 0,01$, respectivamente). No entanto, verificou-se aumento nas concentrações de autoanticorpos IgG anti-LDL(-) em indivíduos com infecção pelo HIV não tratados com TARV em comparação aos não-infectados (Kruskal-Wallis, $p < 0,01$). Isto pode indicar que os neoepítomos formados na partícula de LDL(-), como consequência da infecção viral, são importantes para a indução do sistema imune-humoral e da resposta imune adaptativa. Estudos também demonstraram que anticorpos IgG contra as formas oxidadas de LDL podem ser encontrados em concentrações aumentadas em indivíduos com infecção pelo HIV tratados com TARV (DA CUNHA et al., 2013; ORELLANA et al., 2013).

O presente estudo também demonstrou a presença de anticorpos IgM específicos contra LDL(-) na circulação de indivíduos com e sem infecção pelo HIV. Alguns autores discutem o caráter protetor destes anticorpos IgM no processo da aterosclerose, uma vez que devido à configuração molecular tenderiam a ficar restritos na circulação. Esse fato limitaria seu depósito no espaço subendotelial na forma de imunocomplexos, reforçando a evidência de que os anticorpos isolados de lesões ateromatosas são da classe IgG (LOPES-VIRELLA; VIRELLA, 2013).

A comparação dos grupos HIV-NT e HIV-TARV demonstrou que a TARV promoveu diminuição das concentrações dos anticorpos anti-LDL(-)-IgG e aumentou os níveis de LDL-oxi (Kruskal-Wallis, $p < 0,01$), demonstrando que a TARV diminui a resposta imune-humoral adaptativa específica para a partícula de LDL minimamente modificada endogenamente (LDL-), mesmo na presença de maior oxidação lipídica (indicada pela LDL-oxi). Estudos também demonstraram concentrações séricas aumentadas da LDL-oxi em indivíduos com infecção pelo HIV tratados com TARV, principalmente quando relacionada com a presença de lipodistrofia, em comparação com indivíduos sem infecção pelo HIV. Esse aumento da forma oxidada de LDL associado a outros fatores de risco como alterações endoteliais e metabólicas, incluindo resistência a insulina, poderiam aumentar o risco e favorecer a progressão da aterosclerose nestes indivíduos. Também foi demonstrado aumento nas concentrações de anticorpos IgG contra LDL-oxi em indivíduos com infecção pelo HIV com diminuição de células CD4 (ORELLANA et al., 2013).

A aterosclerose é um processo acompanhado por inflamação e ativação imune persistente. O desenvolvimento de lesões ateroscleróticas antes do início do TARV pode ser parcialmente responsável pelo aumento persistente de biomarcadores inflamatórios e de ativação imune (BELTRÁN et al., 2015). Estudos demonstraram concentrações ligeiramente menores de IgM anti-LDL-MDA em indivíduos com infecção pelo HIV e concentrações aumentadas de IgG anti-LDL-MDA, anti-LDL-oxi e IgG total, quando comparados com indivíduos sem infecção pelo HIV (YILMAZ; JENNBACKEN; FOGELSTRAND, 2014). Da Cunha e colaboradores (2013) também reportaram que indivíduos infectados pelo HIV apresentaram concentrações aumentadas de IgG anti-LDL oxidada por cobre. Forte correlação entre IgG anti-LDL-MDA e IgG anti-LDL-oxi e entre IgM anti-LDL-MDA e IgM anti-LDL-oxi foram identificadas para pacientes HIV positivos (DA CUNHA et al., 2013). As concentrações baixas de IgM contra formas oxidadas de LDL foram associadas com risco aumentado de aterosclerose. O aumento de IgG anti-LDL(-) observados nos pacientes HIV positivos em nosso estudo está de acordo com os dados reportados por Da Cunha e colaboradores (2013) e com as concentrações aumentadas de IgG contra LDL-oxi e LDL-MDA descritas por Yilmaz, Jennbacken e Fogelstrand (2014). Esse aumento de imunoglobulinas IgG reativas às formas modificadas de LDL pode refletir o aumento na atividade do sistema imune humoral contra auto-antígenos formados devido à infecção pelo HIV.

Alguns estudos demonstraram aumento de anticorpos IgG contra LDL-oxi em pacientes com doença coronariana arterial verificada por angiografia, quando comparados com indivíduos saudáveis, enquanto outros estudos não conseguiram evidenciar essa relação. A associação dos autoanticorpos contra LDL-oxi à aterosclerose tem sido realizada pela avaliação da espessura média-íntima das carótidas verificada por ultrassonografia. Estudos verificaram relação inversa entre os títulos de anticorpos IgG e IgM contra partículas de LDL oxidadas e a espessura medial-intimal em homens e mulheres (NILSSON et al., 2007). Em relação à espessura média-íntima das carótidas direita e esquerda, não foram identificadas diferenças significativas entre os grupos estudados.

A resposta imune é composta de dois sistemas intimamente relacionados, a resposta inata e a resposta adaptativa, que se regulam um ao outro. A imunidade inata representa uma resposta inflamatória rápida contra microrganismos invasores, mas também apresenta interação com vários antígenos endógenos modificados, envolvendo receptores, produção de citocinas, fatores do sistema complemento e

anticorpos. A resposta adaptativa é mais específica e pode necessitar de alguns dias ou semanas para ser efetiva, envolvendo as células B e T na produção de imunoglobulinas que reconhecem os auto-antígenos (NILSSON et al., 2007). A partícula de LDL(-) é alvo de ambas as respostas inata e adaptativa, pois seus anticorpos e imunocomplexos foram detectados em amostras de plasma dos participantes deste estudo.

Estudos sobre a produção de citocinas relacionadas com as repostas Th1 (mediada por células) e Th2 (humoral) demonstraram que indivíduos com infecção pelo HIV apresentam alterações na resposta imune humoral. A hipótese proposta para essas alterações relaciona-se ao balanço entre a resposta imune Th1 e Th2, onde as atividades celulares Th1 estão diminuídas, enquanto as atividades Th2 aumentam em indivíduos com a infecção pelo HIV. De fato, as alterações críticas no balanço de citocinas poderiam explicar as contradições encontradas nos estudos realizados com esses indivíduos. As proteínas virais seriam responsáveis pela indução da síntese de citocinas da resposta Th2, pois atuariam como alergênicos na indução da resposta imune humoral. Assim, indivíduos com infecção pelo HIV apresentariam uma troca da resposta imune protetora Th1 para um perfil dominante de citocinas da resposta Th2, à medida que ocorre progressão para aids (BECKER, 2004). Neste estudo, foi verificado aumento de anticorpos anti-LDL(-)-IgG no grupo HIV-NT, que poderia ser relacionado com o perfil Th2 de resposta imune nestes indivíduos. Estudos sugerem que a resposta Th1 contribuiria para o processo da aterosclerose, enquanto a resposta Th2 teria um papel protetor (NILSSON et al., 2007).

A SAA foi relacionada com a indução de alterações endoteliais, sendo sugerida sua participação no processo aterogênico e possível papel como alvo terapêutico. Estudos epidemiológicos demonstraram concentrações aumentadas de SAA associadas com angina instável e infarto agudo do miocárdio, indicando prognósticos desfavoráveis. Lesões ateroscleróticas humanas também expressaram SAA, sugerindo sua contribuição para a formação da placa de ateroma (HUA et al., 2009). Neste estudo, as concentrações de SAA não apresentaram diferenças entre os grupos estudados.

A MPO tem sido considerada como um biomarcador de risco de DCV, pois está aumentada em pacientes com doença arterial coronariana (SIASOS et al., 2015), sendo também relacionada com o processo de oxidação da LDL no espaço subendotelial (STROBEL et al., 2011). Entretanto, em nosso estudo observamos

diminuição das concentrações de MPO nos grupos HIV-NT e HIV-TARV em relação ao grupo controle (Kruskal-Wallis, $p < 0,01$), indicando que a infecção viral está modulando a resposta inflamatória e oxidativa nestes indivíduos. Esse comportamento também foi encontrado em estudos realizados com indivíduos com infecção pelo HIV, onde concentrações de MPO foram negativamente relacionadas com eventos cardiovasculares como infarto, isquemia ou revascularização do miocárdio. Concentrações diminuídas de MPO foram demonstradas em indivíduos com infecção pelo HIV, quando comparados com indivíduos saudáveis. Hipóteses sugerem que a fisiopatologia do processo aterosclerótico em pacientes com infecção pelo HIV seria diferente quando comparada com indivíduos sem infecção (STROBEL et al., 2011).

O vírus HIV também promove aterogênese por seus efeitos no metabolismo lipídico, incluindo diminuição de HDL e ApoA-I e aumento de triglicérides e LDL-colesterol (BELTRÁN et al. 2015). Como esperado, esse perfil também foi encontrado nos indivíduos do presente estudo, conforme avaliado anteriormente por EIRA (2009). As apolipoproteínas ApoA-I e ApoB, representam a parte proteica das partículas de HDL e LDL, respectivamente. Yilmaz e col. (2014) não encontraram diferenças para ApoB e ApoA-I entre indivíduos HIV positivos e indivíduos não infectados. Como esperado, encontraram correlação positiva entre as concentrações de ApoB e as concentrações de colesterol, bem como entre ApoA-I e HDL-colesterol (YILMAZ; JENNBÄCKEN; FOGELSTRAND, 2014). No presente estudo, os biomarcadores de composição proteica de lipoproteínas, ApoA-I, ApoB e ApoE, também não apresentaram diferenças entre os grupos estudados (HIV-TARV, HIV-NT e controle) e verificou-se que a ApoA-I correlacionou-se positivamente com ApoB e ApoE ($r_s = 0,418$ e $r_s = 0,347$, Spearman, $p < 0,01$) e a ApoB com ApoE ($r_s = 0,286$, Spearman, $p < 0,01$).

Para estes mesmos grupos estudados, Eira e colaboradores (2012) descreveram aumento da velocidade de onda de pulso (VOP) para o grupo HIV-TARV, principalmente entre mulheres, concluindo que rigidez arterial está relacionada à TARV, mas não à infecção viral. A rigidez arterial tem sido considerada para avaliação prognóstica de hipertensão e eventos cardiovasculares e a medida de VOP é realizada de forma não invasiva e com técnicas reprodutíveis em estudos epidemiológicos. Valores aumentados de VOP sugerem aumento da rigidez arterial indicando perda da elasticidade da parede arterial, podendo ser relacionada a eventos cardiovasculares futuros (EIRA et al., 2012). Entretanto, não foram identificadas diferenças para

variabilidade de batimentos cardíacos entre estes mesmos grupos estudados, nem associação entre esta taxa de variabilidade e as concentrações de PCR (BENSEÑOR et al., 2011). Também foi demonstrado que o grupo HIV-TARV apresentou maior prevalência de síndrome metabólica e escore de risco de Framingham aumentado quando comparado com os grupos controle e HIV-NT, favorecendo o maior risco para esse grupo de indivíduos (EIRA, 2009). De fato, pacientes com infecção pelo HIV apresentam alta prevalência (25%) de síndrome metabólica (BELTRÁN et al., 2015).

Está bem documentado que indivíduos com risco aumentado de DCV apresentam concentrações aumentadas de LDL circulante e diminuição na proporção de HDL circulante. LDL é a principal fonte de colesterol e lipídeos que contribuem para o desenvolvimento da placa aterosclerótica, enquanto a HDL não é aterogênica e suas concentrações se correlacionam inversamente com o risco cardiovascular (IVANOVA; BOBRY SHEV; OREKHOV, 2015).

Uma característica amplamente reconhecida do processo aterosclerótico é o acúmulo de lipídeos, na maioria das vezes LDL, no espaço subendotelial, estimulando a resposta inflamatória local, a formação de células espumosas e da placa de ateroma. Nas últimas duas décadas, vários estudos investigaram as modificações da LDL, que tem sido consideradas capazes de transformar essas lipoproteínas de carregadores saudáveis de colesterol em gatilhos ameaçadores da aterogênese (BRUNELLI et al., 2014). A dislipidemia é um dos fatores modificáveis relacionados com o risco cardiovascular e tem sido demonstrada em indivíduos com infecção pelo HIV tratados com TARV. Indivíduos com infecção pelo HIV não tratados com TARV também apresentam alterações lipídicas devido à infecção viral. Esse indivíduos apresentam um perfil lipídico aterogênico com diminuição de HDL, aumento de triglicérides e aumento de LDL, especialmente de suas formas modificadas. Também foi observada maior prevalência de aterosclerose subclínica em homens com infecção pelo HIV (GIANNARELLI; KLEIN; BADIMON, 2011). Assim, buscou-se observar se indivíduos HIV positivos, tratados ou não tratados, possuem níveis alterados de biomarcadores de risco cardiovascular, incluindo as formas de LDL modificada, quando comparados com indivíduos não infectados pelo HIV.

As limitações deste estudo incluem o pequeno tamanho amostral, que implica em menor poder das associações estatísticas limitando as conclusões dos resultados, além do desenho transversal que não permite identificar a relação com o desfecho clínico de DCV, apesar de permitir associações com dados de ateromatose

subclínica coletados no momento da obtenção das amostras, que não foi objeto deste estudo.

Em resumo, os principais achados do presente estudo realizado com indivíduos com infecção pelo HIV, tratados e não tratados com TARV, estão indicados no quadro a seguir:

Biomarcador	Principal Achado
LDL(-)	sem diferenças entre grupos
LDL-oxi	controle < HIV-NT HIV-NT < HIV-TARV
LDL-HNE	controle > HIV-NT controle > HIV-TARV
LDL-CML	controle > HIV-NT controle > HIV-TARV
Anti-LDL(-)-IgG	controle < grupo HIV-NT HIV-NT > HIV-TARV
Anti-LDL(-)-IgM	sem diferenças entre grupos
IC-LDL(-)	sem diferenças entre grupos
SAA	sem diferenças entre grupos
MPO	controle > HIV-TARV HIV-NT < HIV-TARV
ApoA-I	sem diferenças entre grupos
ApoB	sem diferenças entre grupos
ApoE	sem diferenças entre grupos

Anti-LDL(-)-IgG: autoanticorpos IgG anti-lipoproteína de baixa densidade eletronegativa; **Anti-LDL(-)-IgM:** autoanticorpos IgM anti-lipoproteína de baixa densidade eletronegativa; **ApoA-I:** apolipoproteína A-I; **ApoB:** apolipoproteína B; **ApoE:** apolipoproteína E; **Controle:** indivíduos sem infecção pelo HIV; **HIV-NT:** indivíduos com infecção pelo HIV não tratados com terapia antirretroviral; **HIV-TARV:** indivíduos com infecção pelo HIV tratados com terapia antirretroviral; **HIV:** vírus da imunodeficiência humana; **IC-LDL(-):** imunocomplexos de lipoproteína de baixa densidade eletronegativa; **LDL(-):** lipoproteína de baixa densidade eletronegativa; **LDL-CML:** lipoproteína de baixa densidade oxidada modificada por carboximetila; **LDL-HNE:** lipoproteína de baixa densidade oxidada modificada por 4-hidroxi-nonenal; **LDL-oxi:** lipoproteína de baixa densidade oxidada modificada por malondialdeído; **MPO:** mieloperoxidase; **SAA:** proteína amiloide sérica A

8. CONCLUSÕES

Em conclusão,

- ⇒ A infecção pelo HIV modificou o biomarcador de inflamação MPO e o perfil de biomarcadores relacionados às modificações oxidativas da LDL (menor formação de LDL-HNE e LDL-CML), além de aumentar a resposta imune-humoral à LDL eletronegativa [anti-LDL(-)-IgG], enquanto o tratamento com antirretrovirais inibiu esta resposta.
- ⇒ Os biomarcadores LDL(-), anti-LDL(-)-IgM, IC-LDL(-), SAA, ApoA-I, ApoB e ApoE não foram modificados pela infecção viral ou pelo tratamento antirretroviral.
- ⇒ Os indivíduos com infecção pelo HIV, tratados com TARV (HIV-TARV) apresentaram diminuição das concentrações de autoanticorpos anti-LDL(-)-IgG e aumento das concentrações de LDL-oxi, quando comparados com indivíduos com infecção pelo HIV não tratados com TARV.
- ⇒ Os biomarcadores LDL(-) e IC-LDL(-) apresentaram correlação inversa, enquanto os autoanticorpos anti-LDL(-)-IgG foram relacionados positivamente com IC-LDL(-) e com os autoanticorpos anti-LDL(-)-IgM.

9.REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- AVOGARO, P.; CAZZOLATO, G.; BITTOLO-BON, G. Some questions concerning a small, more electronegative LDL circulating in human plasma. **Atherosclerosis**, v.91, n.1-2, p.163-71, 1991.
- BAKER, J.; DUPREZ, D. Biomarkers and HIV-associated cardiovascular disease. **Current Opinion in HIV and Aids**, v.5, n.6, p.511-516, 2010.
- BECKER, Y. The changes in the T helper 1 (Th1) and T helper 2 (Th2) cytokine balance during HIV-1 infection are indicative of an allergic response to viral proteins that may be reversed by Th2 cytokine inhibitors and immune response modifiers - a review and hypothesis. **Virus Genes**, v.28, n.1, p.5-18, 2004 (*abstract*).
- BELTRÁN, L.M.; RUBIO-NAVARRO, A.; AMARO-VILLALOBOS, J.M.; EGIDIO, J., GARCÍA-PUIG, J.; MORENO, J.A. Influence of immune activation and inflammatory response on cardiovascular risk associated with the human immunodeficiency virus. **Vascular Health Risk Management**, v.6, n.11, p.35-48, 2015.
- BENSEÑOR, I.M.; EIRA, M.; DOREA, E.L.; DANTAS, E.M.; MILL, J.G.; LOTUFO, P.A. Heart rate variability in HIV patients, diabetics, and controls: the AGATAA study. **International Scholarly Research Network Vascular Medicine**, v.2011, artigo ID876864, 8p., 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5402/2011/876864>. Acesso em: 15 jul. 2014.
- BING, H.; WANG, J.; ZHANG, C.; CAI, H. Positive correlation between *in vivo* oxidized LDL and LDL immune complexes. **Clinical Biochemistry**, v.37, n.1, p.72-5, 2004.
- BJÖRKBACKA, H.; FREDRIKSON, G.N.; NILSSON, J. Emerging biomarkers and intervention targets for immune-modulation of atherosclerosis – a review of the experimental evidence. **Atherosclerosis**, v.227, n.1, p.9-17, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Saúde Brasil 2014:** uma Análise da Situação de Saúde e das Causas Externas. Brasília: Ministério da Saúde, 2015.

BRUNELLI, R.; DE SPIRITO, M.; MEI, G.; PAPI, M.; PERRONE, G.; STEFANUTTI, C.; PARASASI, T. Misfolding of apoprotein B-100, LDL aggregation and 17- β -estradiol in atherogenesis. **Current Medicinal Chemistry**, v.21, n.20, p.2276-83, 2014.

CHAIT, A.; HAN, C.Y.; ORAM, J.F.; HEINECKE, J.W. Thematic review series: The immune system and atherogenesis. Lipoprotein-associated inflammatory proteins: markers or mediators of cardiovascular disease? **Journal of Lipid Research**, v.46, n.3, p.389-403, 2005.

CROWE, S.M.; WESTHORPE, C.L.; MUKHAMEDOVA, N.; JAWOROWSKI, A.; SVIRIDOV, D.; BUKRINSKY, M. The macrophage: the intersection between HIV infection and atherosclerosis. **Journal of Leukocyte Biology**, v.87, n.4, p.589-98, 2010.

DA CUNHA, J.; FERREIRA MASELLI, L.M.; TREITINGER, A.; MONTEIRO, A.M.; GIDLUND, M.; MARANHÃO, R.C.; SPADA, C.; BYDLOWSKI, S.P. Serum levels of IgG antibodies against oxidized LDL and atherogenic indices in HIV-1-infected patients treated with protease inhibitors. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v.51, n.2, p.371-8, 2013.

DAMASCENO, N.R.; SEVANIAN, A.; APOLINÁRIO, E.; OLIVEIRA, J.M.; FERNANDES, I.; ABDALLA, D.S. Detection of electronegative low density lipoprotein (LDL-) in plasma and atherosclerotic lesions by monoclonal antibody-based immunoassays. **Clinical Biochemistry**, v.39, n.1, p.28-38, 2006.

DOMINICZAK, M.H.; CASLAKE, M.J. Apolipoproteins: metabolic role and clinical biochemistry applications. **Annals of Clinical Biochemistry**, v.48, n.Pt6, p.498-515, 2011.

DUONG, M.; PETIT, J.M.; MARTHA, B.; GALLAND, F.; PIROTH, L.; WALLDNER, A.; GRAPPIN, M.; BUISSON, M.; DUVILLARD, L.; CHAVANET, P.; PORTIER, H. Concentration of circulating oxidized LDL in HIV-infected patients treated with antiretroviral agents: relation to HIV-related lipodystrophy. **HIV Clinical Trials**, v.7, n.2, p.41-7, 2006.

EIRA, M. **Avaliação de ateromatose subclínica em pacientes HIV/aids: determinação da velocidade de onda de pulso (VOP) e da espessura média íntima de carótidas (EMI)**. São Paulo, 2009. 130p. Tese de doutorado, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

EIRA, M.; BENSENOR, I.M.; DOREA, E.L.; CUNHA, R.S.; MILL, J.G.; LOTUFO, P.A. Potent antiretroviral therapy for human immunodeficiency virus infection increases aortic stiffness. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.99, n.6, p.1100-7, 2012.

ESTRUCH, M.; RAJAMÄKI, K.; SANCHEZ-QUESADA, J.L.; KOVANEN, P.T.; ÖÖRNI, K.; BENITEZ, S.; ORDOÑEZ-LLANOS J. Electronegative LDL induces priming and inflammasome activation leading to IL-1 β release in human monocytes and macrophages. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1851, n.11, p.1442-9, 2015.

FAULIN, T.E.S. **Desenvolvimento de imunoensaios e biossensores para determinação de LDL eletronegativa**. São Paulo, 2010. 118p. Tese de doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

FAULIN, T.E.S.; SENA-EVANGELISTA, K.C.; PACHECO, D.B.; AUGUSTO, E.M.; ABDALLA, D.S. Development of immunoassays for anti-electronegative LDL autoantibodies and immune complexes. **Clinica Chimica Acta**, v.413, n.1-2, p.291-7, 2012.

Four Parameter Logistic Curve. Ferramenta *online* para análise de dados, MyAssays Ltd., 25/10/2012. Disponível em: <http://www.myassays.com/four-parameter-logistic-curve.assay>. Acesso em: 06 mai. 2016.

GIANNARELLI, C.; KLEIN, R.S.; BADIMON, J.J. Cardiovascular implications of HIV-induced dyslipidemia. **Atherosclerosis**, v.219, n.2, p.384-9, 2011.

GORDILHO, A.; SÉRGIO, J.; SILVESTRE, J.; RAMOS, L.R.; FREIRE, M.P.A.; ESPINDOLA, N.; MAIA, R.; VERAS, R.; KARSCH, U. **Desafios a serem enfrentados no terceiro milênio pelo setor saúde na atenção integral ao idoso**. Universidade Aberta da Terceira Idade (UnATI), Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 92p. Rio de Janeiro, 2000.

HILEMAN, C.O.; TURNER, R.; FUNDERBURG, N.T.; SEMBA, R.D.; McCOMSEY, G.A. Changes in oxidized lipids drive the improvement in monocyte activation and vascular disease after statin therapy in HIV. **AIDS**, v.30, n.1, p.65-73, 2016.

HSUE, P.; DEEKS, S.; HUNT, P. Immunologic basis of cardiovascular disease in HIV-infected adults. **Journal of Infectious Diseases**, v.205, n.Suppl3, p.S375-82, 2012.

HUA, S.; SONG, C.; GECZY, C.L.; FREEDMAN, S.B.; WITTING, P.K. A role for acute-phase serum amyloid A and high-density lipoprotein in oxidative stress, endothelial dysfunction and atherosclerosis. **Redox Report: Communications in Free Radical Research**, v.14, n.5, p.187-96, 2009.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Diretoria de Pesquisas, Coordenação de População e Indicadores Sociais, Estudos e Pesquisas, Informação Demográfica e Socioeconômica. **Indicadores de morbidade no Brasil – Programa Nacional DST/aids**, 2009. Disponível em: www.seriesestatisticas.ibge.gov.br. Acesso em: 15 abr. 2016.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Diretoria de Pesquisas, Coordenação de População e Indicadores Sociais, Estudos e Pesquisas, Informação Demográfica e Socioeconômica. **Indicadores**

sociodemográficos e de saúde no Brasil, 2010. Disponível em: www.serieestatisticas.ibge.gov.br. Acesso em: 15 abr. 2016.

IVANOVA, E.A.; BOBRY SHEV, Y.V.; OREKHOV, A.N. LDL electronegativity index: a potential novel index for predicting cardiovascular disease. **Vascular Health and Risk Management**, v.28, n.11, p.525-32, 2015.

KE, L.Y.; STANCEL, N.; BAIR, H.; CHEN, C.H. The underlying chemistry of electronegative LDL's atherogenicity. **Current Atherosclerosis Reports**, v.16, n.8, p.428, 2014.

LO, J. Dyslipidemia and lipid management in HIV-infected patients. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity**, v.18, n.2, p.144-147, 2011.

LOPES-VIRELLA, M.F.; McHENRY, M.B.; LIPSITZ, S.; YIM, E.; WILSON, P.F.; LACKLAND, D.T.; LYONS, T.; JENKINS, A.J.; VIRELLA, G.; DCCT/EDIC Research Group. Immune complexes containing modified lipoproteins are related to the progression of internal carotid intima-media thickness in patients with type 1 diabetes. **Atherosclerosis**, v.190, n.2, p. 359-69, 2007.

LOPES-VIRELLA, M.F.; VIRELLA, G. Pathogenic role of modified LDL antibodies and immune complexes in atherosclerosis. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v.20, n.10, p.743-54, 2013.

MELLO, A.P.; da SILVA, I.T.; ABDALLA, D.S.; DAMASCENO, N.R. Electronegative low-density lipoprotein: origin and impact on health and disease. **Atherosclerosis**, v.215, n.2, p.257-65, 2011.

MIRONOVA, M.A.; KLEIN, R.L.; VIRELLA, G.T.; LOPES-VIRELLA, M.F. Anti-modified antibodies, LDL-containing immune complexes, and susceptibility of LDL to *in vitro* oxidation in patients with type 2 diabetes. **Diabetes**, v.49, n.6, p.1033-41, 2000.

- NICCOLI, G.; BACÀ, M.; DE SPIRITO, M., PARASASSI, T.; COSENTINO, N.; GRECO, G.; CONTE, M.; MONTONE, R.A.; ARCOVITO, G.; CREA, F. Impact of electronegative low-density lipoprotein on angiographic coronary atherosclerotic burden. **Atherosclerosis**, v.223, n.1, p.166-70, 2012.
- NILSSON, J.; NORDIN FREDRIKSON, G.; SCHIOPU, A.; SHAH, P.K.; JANSSON, B.; CARLSSON, R. Oxidized LDL antibodies in treatment and risk assessment of atherosclerosis and associated cardiovascular disease. **Current Pharmaceutical Design**, v.13, n.10, p.1021-30, 2007.
- NOU, E; LO, J.; HADIGAN, C.; GRINSPOON, S.K. Pathophysiology and management of cardiovascular disease in patients with HIV. **The Lancet Diabetes & Endocrinology**, v.4, n.7, p.598-610, 2016a.
- NOU, E.; LU, M.T.; LOOBY, S.E.; FITCH, K.V.; KIM, E.A.; LEE, H.; HOFFMANN, U.; GRINSPOON, S.K.; LO, J. Serum oxidized low-density lipoprotein decreases in response to statin therapy and relates independently to reductions in coronary plaque in patients with HIV. **AIDS**, v.30, n.4, p.583-90, 2016b.
- OLIVEIRA, J.A.; SEVANIAN, A.; RODRIGUES, R.J.; APOLINÁRIO, E.; ABDALLA, D.S. Minimally modified electronegative LDL and its autoantibodies in acute and chronic coronary syndromes. **Clinical Biochemistry**, v.39, n.7, p.708-14, 2006.
- ORELLANA, R.V.; FONSECA, H.A.; MONTEIRO, A.M.; ORTEGA, K.L.; GALLOTTINI, M.H.; GIDLUND, M.; POBOCIK, A.M. Association of autoantibodies anti-OxLDL and markers of inflammation with stage of HIV infection. **International Journal of Cardiology**, v.168, n.2, p.1610-2, 2013.
- PENTIKÄINEN, M.O.; ÖÖRNI, K.; KOVANEN, P.T. Myeloperoxidase and hypochlorite, but not copper ions, oxidize heparin-bound LDL particles and release them from heparin. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.21, n.12, p.1902-8, 2001.

- SÁNCHEZ-QUESADA, J.L.; VILLEGAS, S.; ORDÓÑEZ-LLANOS, J. Electronegative low-density lipoprotein. A link between apolipoprotein B misfolding, lipoprotein aggregation and proteoglycan binding. **Current Opinion in Lipidology**, v.23, n.5, p.479-86, 2012.
- SIASOS, G.; TSIGKOU, V.; OIKONOMOU, E.; ZAROMITIDOU, M.; TSALAMANDRIS, S.; MOUROUZIS, K.; VAVURANAKIS, M.; ANASTASIOU, M.; VLASIS, K.; LIMPERI, M.; GENNIMATA, V.; BOLETIS, J.N.; PAPAVALASSILIOU, A.G.; TOUSOULIS, D. Circulating biomarkers determining inflammation in atherosclerosis progression. **Current Medicinal Chemistry**, v.22, n.22, p.2619-35, 2015.
- STANCEL, N.; CHEN, C.C.; KE, L.Y.; CHU, C.S.; LU, J.; SAWAMURA, T.; CHEN, C.H. Interplay between CRP, atherogenic LDL, and LOX-1 and its potential role in the pathogenesis of atherosclerosis. **Clinical Chemistry**, v.62, n.2, p.320-7, 2016.
- STROBEL, N.A.; FASSETT, R.G.; MARSH, S.A.; COOMBES, J.S. Oxidative stress biomarkers as predictors of cardiovascular disease. **International Journal of Cardiology**, v.147, n.2, p.191-201, 2011.
- TELLES, A.E.R. **Clonagem e expressão de fragmentos de anticorpos de cadeia única (scFv) anti-LDL eletronegativa em *Pichia pastoris***. São Paulo, 2008. 90p. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.
- TSIMIKAS, S.; MILLER, Y.I. Oxidative modification of lipoproteins: mechanisms, role in inflammation and potential clinical applications in cardiovascular disease. **Current Pharmaceutical Design**, v.17, n.1, p.27-37, 2011.
- UHLAR, C.M.; WHITEHEAD, A.S. Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant. **European Journal of Biochemistry**, v.265, n.2, p.501-23, 1999.

VIRELLA, G.; LOPES-VIRELLA, M.F. Lipoprotein autoantibodies: measurement and significance. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.10, n.4, p.499-505, 2003.

XAVIER, H.T.; IZAR, M.C.; FARIA NETO, J.R.; ASSAD, M.H.; ROCHA, V.Z.; SPOSITO, A.C.; FONSECA, F.A.; dos SANTOS, J.E.; SANTOS, R.D.; BERTOLAMI, M.C.; FALUDI, A.A.; MARTINEZ, T.L.R.; DIAMENT, J.; GUIMARÃES, A.; FORTI, N.A.; MORIGUCHI, E.; CHAGAS, A.C.P.; COELHO, O.R.; RAMIRES, J.A.F. V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.101, n.4, p.1-20, 2013.

YILMAZ, A.; JENNBACHEN, K.; FOGELSTRAND, L. Reduced IgM levels and elevated IgG levels against oxidized low-density lipoproteins in HIV-1 infection. **BMC Infectious Diseases**, v.17, n.14, p.143, 2014.

ZAKYNTHINOS, E.; PAPPA, N. Inflammatory biomarkers in coronary artery disease. **Journal of Cardiology**, v.53, n.3, p.317-33, 2009.

ZIDAR, D.A.; JUCHNOWSKI, S.; FERRARI, B.; CLAGETT, B.; PILCH-COOPER, H.A.; ROSE, S.; RODRIGUEZ, B.; McCOMSEY, G.A.; Sieg, S.F.; MEHTA, N.N.; LEDERMAN, M.M.; FUNDERBURG, N.T. Oxidized LDL levels are increased in HIV infection and may drive monocyte activation. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v.69, n.2, p.154-60, 2015.

ANEXO I

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

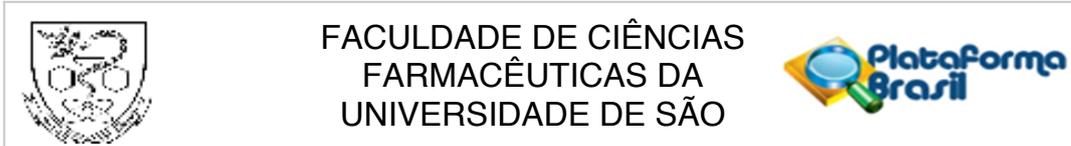
5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Presidente da CPG/FCF/USP

ANEXO II-A

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da FCF-USP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Determinação de Biomarcadores de Risco Cardiovascular em Pacientes HIV Positivos

Pesquisador: Dulcineia Saes Parra Abdalla

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 25639513.9.0000.0067

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 663.120

Data da Relatoria: 28/04/2014

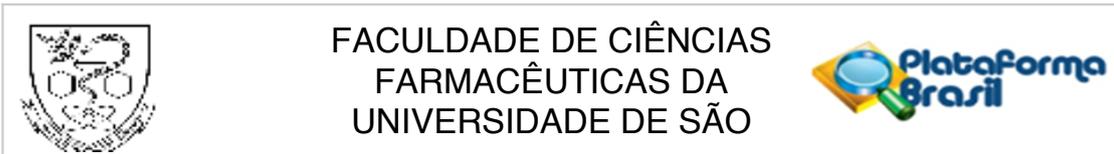
Apresentação do Projeto:

Indivíduos infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) apresentam maior incidência de complicações cardiovasculares do que indivíduos da mesma faixa etária não infectados. Por outro lado, a terapia antirretroviral reduz o risco cardiovascular em indivíduos tratados. O estudo de biomarcadores de risco cardiovascular em pacientes HIV positivos pode contribuir para a identificação de marcadores relacionados ao desenvolvimento da placa de ateroma, permitindo a avaliação do risco de doença arterial coronariana nestes indivíduos. Assim, na pesquisa proposta, serão empregados métodos por imunoenensaio para quantificação plasmática de marcadores lipídicos como lipoproteína de baixa densidade eletronegativa (LDL(-)), autoanticorpos anti-LDL(-), imunocomplexos IC-LDL(-), proteína C reativa, proteína amiloide sérica A, mieloperoxidase, apolipoproteína A-I, apolipoproteína B e apolipoproteína E em pacientes HIV positivos, para verificar sua relação com marcadores conhecidos na avaliação do risco cardiovascular.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo da pesquisa é avaliar a relação entre marcadores lipídicos em pacientes HIV positivos tratados, em pacientes HIV positivos não tratados e em pacientes saudáveis (grupo controle) e avaliar a relação entre estes marcadores e o perfil inflamatório e imunológico dos pacientes

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 **Fax:** (11)3031-8986 **E-mail:** cepfcf@usp.br



Continuação do Parecer: 663.120

estudados para identificar marcadores de risco cardiovascular em pacientes HIV positivos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A pesquisa é descrita como de risco mínimo, com garantia de confidencialidade das informações e dados gerais dos participantes da pesquisa. Não foram identificados benefícios diretos para os participantes, pois o objetivo da pesquisa é identificar diferenças de biomarcadores entre os grupos estudados. O benefício da pesquisa é contribuir para a compreensão das condições relacionadas ao risco cardiovascular em pacientes HIV positivos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Este estudo utilizará amostras provenientes de biorrepositório de material biológico constituído por ocasião da pesquisa intitulada "Avaliação de ateromatose subclínica em pacientes HIV/AIDS: determinação da velocidade de onda de pulso e da espessura média íntima de carótidas", dos pesquisadores Paulo Andrade Lotufo (pesquisador principal), Margareth da Eira, Egidio Lima Dórea, Ilka Regina de Oliveira, Ana Lúcia Sassaki, Isabela Martins Benseñor e Gelba de Almeida Pinto, aprovada pelo CEP do Hospital Universitário (HU) da USP (Registro CEP-HU/USP: 807/08) e registrada no sistema SISNEP-CAAE sob o número 0019.0.198.015-08.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram anexados: declaração de anuência do pesquisador Paulo Andrade Lotufo, pesquisador principal do projeto que originou as amostras; declaração de participação de Luciane Marzullo Cicarelli, aluna de doutorado do Programa de Pós-graduação em Análises Clínicas da FCF-USP; declaração de anuência do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP; cronograma (no projeto de pesquisa detalhado); TCLE do projeto de pesquisa "Avaliação de ateromatose subclínica em pacientes HIV/AIDS: determinação da velocidade de onda de pulso e da espessura média íntima de carótidas", que originou as amostras, no qual é informado que o estudo tem por objetivo avaliar o risco cardiovascular em pacientes HIV positivos, que a amostra de sangue coletada será armazenada para dosagens futuras, que os resultados parciais serão divulgados aos participantes e que o material coletado será usado exclusivamente para os objetivos daquela pesquisa. Algumas análises que serão realizadas no presente projeto não estão descritas no TCLE, entretanto são análises afins às previstas no projeto que originou as amostras.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As recomendações do parecer anterior deste CEP foram atendidas.

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 **Fax:** (11)3031-8986 **E-mail:** cepfcf@usp.br



FACULDADE DE CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO



Continuação do Parecer: 663.120

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Tendo em vista as considerações acima, este CEP entende que o projeto pode ser aprovado.

SAO PAULO, 27 de Maio de 2014

Assinado por:
Mauricio Yonamine
(Coordenador)

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 **Fax:** (11)3031-8986 **E-mail:** cepf@usp.br

ANEXO II-B

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da FM-USP



Fls.nº	07
CEP/HU-USP	7

São Paulo, 16 de maio de 2008.

Il^{mo(a)}. S^{ra}(a).

Prof. Dr. Paulo Andrade Lotufo
Superintendência
Hospital Universitário
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

REFERENTE: **Projeto de Pesquisa** “*Aterosclerose subclínica em pacientes HIV/aids em tratamento ou não com inibidores da protease: determinação da velocidade de onda de pulso e da espessura média-intima de carótidas*” - **Co-autor(es)**: Margareth da Eira, Dr. Egidio Lima Dórea, Dra. Ilka Regina de Oliveira, Dra. Ana Lúcia Sasaki, Profa. Dra. Isabela Martins Benseñor, Dra. Gelba de Almeida Pinto – **CEP-HU/USP**: 807/08 – **SISNEP CAAE**: 0019.0.198.015-08.

Prezado(a) Senhor(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em reunião ordinária realizada no dia 16 de maio de 2008, analisou o Projeto de Pesquisa acima citado, considerando-o como **APROVADO**, bem como o seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final, em função da duração da pesquisa), de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, item IX.2.c.

O primeiro relatório está previsto para 16 de maio de 2009.

Atenciosamente,

Dr. Mauricio Seckler
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital Universitário da USP



Fls.nº	67
CEP/HU-USP	7

São Paulo, 16 de maio de 2008.

Ilmo(a). Sr(a).

Prof. Dr. Paulo Andrade Lotufo
Superintendência
Hospital Universitário
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

REFERENTE: **Projeto de Pesquisa** “*Aterosclerose subclínica em pacientes HIV/aids em tratamento ou não com inibidores da protease: determinação da velocidade de onda de pulso e da espessura média-intima de carótidas*” - **Co-autor(es)**: Margareth da Eira, Dr. Egidio Lima Dórea, Dra. Ilka Regina de Oliveira, Dra. Ana Lúcia Sasaki, Profa. Dra. Isabela Martins Benseñor, Dra. Gelba de Almeida Pinto – **CEP-HU/USP**: 807/08 – **SISNEP CAAE**: 0019.0.198.015-08.

Prezado(a) Senhor(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em reunião ordinária realizada no dia 16 de maio de 2008, analisou o Projeto de Pesquisa acima citado, considerando-o como **APROVADO**, bem como o seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final, em função da duração da pesquisa), de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, item IX.2.c.

O primeiro relatório está previsto para 16 de maio de 2009.

Atenciosamente,

Dr. Mauricio Seckler
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital Universitário da USP



Fls. nº 07	D
CEP/HU-USP	7

São Paulo, 16 de maio de 2008.

Il^{mo}(a). S^{ra}(a).

Prof. Dr. Paulo Andrade Lotufo
 Superintendência
 Hospital Universitário
 UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

REFERENTE: **Projeto de Pesquisa** “*Aterosclerose subclínica em pacientes HIV/aids em tratamento ou não com inibidores da protease: determinação da velocidade de onda de pulso e da espessura média-intima de carótidas*” - **Co-autor(es)**: Margareth da Eira, Dr. Egidio Lima Dórea, Dra. Ilka Regina de Oliveira, Dra. Ana Lúcia Sasaki, Profa. Dra. Isabela Martins Benseñor, Dra. Gelba de Almeida Pinto – **CEP-HU/USP**: 807/08 – **SISNEP CAAE**: 0019.0.198.015-08.

Prezado(a) Senhor(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em reunião ordinária realizada no dia 16 de maio de 2008, analisou o Projeto de Pesquisa acima citado, considerando-o como **APROVADO**, bem como o seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final, em função da duração da pesquisa), de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, item IX.2.c.

O primeiro relatório está previsto para 16 de maio de 2009.

Atenciosamente,


Dr. Maurício Seckler
 Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
 Hospital Universitário da USP

ANEXO III

Ficha do Aluno

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9136 - 964016/2 - Luciane Marzzullo Cicarelli

Email: lucianemc@usp.br
Data de Nascimento: 19/12/1971
Cédula de Identidade: RG - 19.684.497-6 - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Farmacêutico-Bioquímico - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 1996
Mestrado: Mestre em Farmácia - Área: Análises Clínicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2003

Curso: Doutorado
Programa: Farmácia (Análises Clínicas)
Área: Análises Clínicas
Data de Matrícula: 04/07/2012
Início da Contagem de Prazo: 04/07/2012
Data Limite para o Depósito: 04/07/2016
Orientador: Prof(a). Dr(a). Dulcineia Saes Parra Abdalla - 04/07/2012 até o presente. Email: dspa@usp.br
Co-orientador: Prof(a). Dr(a). Martinho Isnard Ribeiro de Almeida - 27/09/2012 até 22/07/2014. Email: martinho@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 04/07/2012
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 29/08/2014
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 04/07/2012

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 01/02/2016

Impresso em: 26/04/2016 16:18:04



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9136 - 964016/2 - Luciane Marzzullo Cicarelli

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
EDM5791-5/9	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	15/08/2012	30/11/2012	120	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
FSP5703-1/2	Aspectos Pedagógicos do Ensino Superior em Saúde (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	17/08/2012	18/10/2012	45	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
EAD5943-3/2	Análise do Ambiente Organizacional para o Planejamento Estratégico (Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade - Universidade de São Paulo)	04/03/2013	28/06/2013	120	8	93	A	N	Concluída
FBC5803-3/2	Sistemas de Garantia da Qualidade em Laboratórios de Ensaio	06/08/2013	19/08/2013	30	2	100	A	N	Concluída
FBC5757-4/2	Tópicos em Análises Clínicas II	06/08/2013	18/11/2013	15	1	100	A	N	Concluída
MCM5880-3/1	Bioestatística I (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	06/03/2014	16/04/2014	90	6	92	A	N	Concluída
FBC5780-2/2	Análise de Dados Aplicados às Pesquisas Biológicas	10/03/2014	20/04/2014	90	6	88	A	N	Concluída
MCM5909-1/1	Bioestatística Aplicada à Clínica Médica Usando R (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	17/04/2014	11/06/2014	120	8	88	A	N	Concluída
FBT5700-3/2	Preparo de Artigos Científicos na Área de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica	08/05/2015	09/07/2015	90	6	90	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	37
Estágios:			
Total:	0	20	37

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 01/02/2016

Impresso em: 26/04/2016 16:18:04

ANEXO IV

Critérios de Inclusão e Exclusão dos Indivíduos Selecionados para Participação no Estudo (EIRA, 2009).

16

3. MÉTODOS

3.1 Tipo de estudo

O estudo teve um delineamento transversal com população selecionada composta de indivíduos HIV-positivos (tratados com HAART e não-tratados) e indivíduos HIV-negativos (diabéticos e grupo controle).

3.2 Local e época de realização do estudo

No período compreendido entre fevereiro de 2008 e julho de 2009, o presente estudo foi conduzido no Ambulatório de HIV/aids do Instituto de Infectologia Emílio Ribas (IIER – São Paulo), em parceria com a Divisão de Clínica Médica do Hospital Universitário da USP e com a Unidade de Radiologia do Hospital Universitário da USP.

3.3 População do estudo

Foram convidados a participar deste estudo pacientes do ambulatório de HIV/aids devidamente matriculados no IIER e pacientes do ambulatório de Doenças Metabólicas da Divisão de Clínica Médica do Hospital Universitário da USP, que compareceram para visita de rotina no período citado. Além disto, funcionários saudáveis de ambos os sexos da Universidade de São Paulo e institutos associados (Pesquisa Tecnológica e Pesquisas em Energia Nuclear) foram recrutados através de carta-convite a participar voluntariamente como grupo controle. Os indivíduos deviam atender aos critérios de inclusão estabelecidos e não podiam se enquadrar em nenhum dos critérios de exclusão. Antes de quaisquer procedimentos do estudo, deviam ser capazes de fornecer o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – Anexo B) por escrito, segundo as normas vigentes.

Foram incluídos 118 participantes de ambos os sexos com idade entre 20 e 69 anos. Os pacientes selecionados foram distribuídos em 4 grupos:

1. indivíduos com infecção pelo HIV que não estavam em uso de terapia anti-retroviral – grupo *naïve* (n=28).
2. indivíduos HIV/aids tratados com terapia anti-retroviral altamente potente (grupo HAART), incluindo ou um IP ou um ITRNN (n= 29)
3. indivíduos diabéticos não insulino-dependentes, em acompanhamento no ambulatório de Doenças Metabólicas do HU-USP (n=29).
4. controle - indivíduos saudáveis, funcionários da Universidade de São Paulo ou de instituições associadas (n=32).

Os grupos controle e diabetes deviam ser pareados aos grupos 1 e 2 segundo sexo e idade, tentando-se ao máximo respeitar a proporcionalidade em relação a estes parâmetros da população de pacientes do ambulatório de HIV/aids.

3.4 Critérios de inclusão

Os critérios de inclusão estabelecidos para o estudo foram os seguintes (gerais e grupo-específicos):

1. idade entre 20 e 69 anos, ambos os sexos (todos os grupos);
2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido lido e assinado (todos os grupos);
3. acompanhamento médico regular, com ausência de faltas às três últimas consultas agendadas (grupos 1, 2 e 3);
4. infecção pelo HIV documentada por diagnóstico com método sorológico ou PCR (grupos 1 e 2);
5. serem indivíduos infectados com o HIV-1 , porém não estarem em uso ou indicação de uso de terapia anti-retroviral até o momento da inclusão no estudo (grupo 1);
6. serem assintomáticos ou com diagnóstico progressivo de aids, porém não apresentarem doenças definidoras de aids (tais como

- neurotoxoplasmose ou tuberculose extra-pulmonar) que necessitem de tratamento no momento da inclusão no estudo (grupos 1 e 2);
7. para os pacientes HIV/aids em tratamento, estar em uso de HAART por um período > 12 meses e < 15 anos (grupo 2);
 8. indivíduos com diabetes mellitus não insulino-dependentes e HIV negativos (grupo 3).

3.5 Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão definidos para este estudo foram os seguintes (válidos para os quatro grupos):

1. história prévia ou atual de infarto agudo do miocárdio ou de revascularização cirúrgica ou angiográfica do miocárdio;
2. história prévia ou atual de acidente vascular cerebral;
3. história prévia ou atual de doença arterial periférica oclusiva;
4. insuficiência renal crônica definida como depuração de creatinina abaixo de 60 ml/minuto/1,73m²;
5. uso de insulina;
6. doença neoplásica (exceto câncer de pele não-melanoma) ou infecção oportunistamente recentemente diagnosticada;

Os indivíduos selecionados dos 150 convidados receberam informações detalhadas sobre o estudo, seus procedimentos, seus possíveis benefícios ou eventuais riscos, tendo total liberdade para participar ou não do estudo, sem nenhum prejuízo ao seu atendimento ambulatorial de rotina na instituição. Uma vez fornecido o TCLE, todos os participantes de todos os grupos foram submetidos ao protocolo descrito a seguir.

3.6 Protocolo do Estudo:

Após a aceitação e agendamento, todos os participantes do estudo foram submetidos à coleta de sangue após jejum de 12 horas, no mesmo dia da realização do protocolo. Segunda coleta de sangue em jejum foi realizada

ANEXO V

Tabelas com Características Demográficas, Clínicas, Laboratoriais e Funcionais para os Grupos Controle, HIV-NT e HIV-TARV

TABELA I: Características Gerais dos Participantes para Grupos Controle (n=32), HIV-NT (n=28) e HIV-TARV (n=29) (adaptado de EIRA, 2009).

	Controle (n= 32)	HIV-NT (n= 28)	HIV-TARV (n= 29)	Valor de p
Idade (anos)	42,8 (8,1)	42,0 (6,7)	43,6 (8,6)	0,77
Mulheres	15 (46,9)	10 (35,7)	9 (31,0)	0,42
Escolaridade				0,90
Analfabeto	0 (0)	0 (0)	1 (3,5)	
1 a 8 anos	6 (18,8)	7 (25,0)	4 (13,8)	
9 a 11 anos	14 (43,7)	11 (39,3)	12 (41,4)	
> 11 anos	12 (37,5)	10 (35,7)	12 (41,4)	
Raça				0,59
Branca	13 (40,6)	14 (50,0)	13 (44,8)	
Parda	16 (50,0)	12 (42,9)	10 (34,5)	
Negros	3 (9,4)	2 (7,1)	5 (17,2)	
Outros	0 (0)	0 (0)	1 (3,5)	

Resultados apresentados como média (desvio-padrão) ou número de participantes (porcentagem).

Controle: indivíduos sem infecção pelo HIV; **HIV-NT:** indivíduos com infecção pelo HIV não tratados com terapia antirretroviral; **HIV-TARV:** indivíduos com infecção pelo HIV tratados com terapia antirretroviral; **HIV:** vírus da imunodeficiência humana

TABELA II: Antropometria dos Participantes para Grupos Controle (n=32), HIV-NT (n=28) e HIV-TARV (n=29) (adaptado de EIRA, 2009).

	Controle (n= 32)	HIV-NT (n= 28)	HIV-TARV (n= 29)	Valor de p
Peso (kg)	77,5 (17,7)	73,2 (13,4)	74,2 (13,0)	0,53
IMC (kg/m ²)	29,2 (10,4)	26,2 (4,9)	25,8 (3,8)	0,13
Medida de cintura (cm)	89,7 (13,7)	86,9 (11,4)	90,4 (10,8)	0,53
Medida do quadril (cm)	102,9 (9,0) ^a	98,0 (8,6)	96,7 (7,8) ^a	0,01
Relação cintura-quadril	0,87 (0,07) ^b	0,87 (0,08)	0,93 (0,09) ^b	0,004

Resultados apresentados como média (desvio-padrão).

^a grupo controle ≠ grupo HIV-TARV; ^b grupo controle ≠ grupo HIV-TARV

#: diferente; **Controle:** indivíduos sem infecção pelo HIV; **HIV-NT:** indivíduos com infecção pelo HIV não tratados com terapia antirretroviral; **HIV-TARV:** indivíduos com infecção pelo HIV tratados com terapia antirretroviral; **HIV:** vírus da imunodeficiência humana; **IMC:** índice de massa corpórea

TABELA III: Frequência de Fumantes para Grupos Controle (n=32), HIV-NT (n=28) e HIV-TARV (n=29) (adaptado de EIRA, 2009).

	Controle (n= 32)	HIV-NT (n= 28)	HIV-TARV (n= 29)	Valor de p
Nunca fumante (%)	16 (50)	14 (50)	11 (37,9)	0,56
Ex-fumantes (%)	10 (31,3)	8 (28,6)	11 (37,9)	0,16
Fumantes ativos (%)	6 (18,7)	6 (21,4)	7 (24,2)	0,95
Fumantes passivos (%)	11 (34,4)	11 (39,3)	16 (55,2)	0,24

Resultados apresentados como número de participantes (porcentagem).

Controle: indivíduos sem infecção pelo HIV; **HIV-NT:** indivíduos com infecção pelo HIV não tratados com terapia antirretroviral; **HIV-TARV:** indivíduos com infecção pelo HIV tratados com terapia antirretroviral; **HIV:** vírus da imunodeficiência humana

TABELA IV: Frequência de Diagnóstico e Uso de Medicamentos para Tratamento da Hipertensão Arterial para Grupos Controle (n=32), HIV-NT (n=28) e HIV-TARV (n=29) (adaptado de EIRA, 2009).

	Controle (n= 32)	HIV-NT (n= 28)	HIV-TARV (n= 29)	Valor de p
Diagnóstico prévio de hipertensão arterial	6 (18,8)	7 (25,0)	11 (37,9)	0,37
Uso de medicamento para tratamento de hipertensão	9 (28,1)	5 (17,9)	7 (24,1)	0,69
Diagnóstico final de hipertensão arterial	9 (28,1)	8 (28,6)	12 (41,4)	0,47

Resultados apresentados como número de participantes (porcentagem). A hipertensão foi definida como presença prévia de hipertensão confirmada por médico ou uso de medicamento para tratar hipertensão ou pressão arterial sistólica média ≥ 140 mmHg ou pressão arterial diastólica média ≥ 90 mmHg.

Controle: indivíduos sem infecção pelo HIV; **HIV-NT:** indivíduos com infecção pelo HIV não tratados com terapia antirretroviral; **HIV-TARV:** indivíduos com infecção pelo HIV tratados com terapia antirretroviral; **HIV:** vírus da imunodeficiência humana

TABELA V: Frequência de Diabéticos e de Intolerantes à Glicose e Perfil Glicêmico para Grupos Controle (n=32), HIV-NT (n=28) e HIV-TARV (n=29) (adaptado de EIRA, 2009).

	Controle (n= 32)	HIV-NT (n= 28)	HIV-TARV (n= 29)	Valor de p
Diagnóstico prévio de diabetes <i>mellitus</i>	0 (0)	1 (3,6)	4 (13,8)	0,056
Uso de medicamento para tratamento de diabetes <i>mellitus</i>	0 (0)	1 (3,6)	3 (10,3)	0,14
Diagnóstico final de intolerância à glicose	14 (43,8)	8 (28,6)	6 (20,7)	0,28
Diagnóstico final de diabetes <i>mellitus</i>	2 (6,2)	1 (3,6)	5 (17,2)	0,16
Glicemia em jejum (mg/dL)	103,1 (9,8) ^a	98,0 (10,1) ^{a,b}	109,1 (17,2) ^b	0,005
Glicemia pós-carga* (mg/dL)	137,6 (26,9)	122,2 (27,3)	133,8 (38,9)	0,37
Hemoglobina glicada (%)	6,0 (0,4) ^c	5,6 (0,6) ^d	5,2 (0,8) ^{c,d}	<0,0001
Insulina em jejum (μ U/mL)	7,5 (6,7)	6,6 (4,9)	8,0 (5,2)	0,63

Resultados apresentados como número de participantes (porcentagem) ou média (desvio-padrão). O diagnóstico de intolerância à glicose foi definido após teste de tolerância oral à glicose. O diagnóstico de diabetes *mellitus* foi definido como presença prévia de diabetes *mellitus* confirmada por médico ou uso de medicamento para tratar diabetes *mellitus* ou diagnóstico de diabetes *mellitus* após teste de tolerância oral à glicose.

* Glicemia pós-carga corresponde ao teste de tolerância oral à glicose realizado nos tempos 0 e 120min, com ingestão de 75g de glicose anidra.

^a grupo controle \neq grupo HIV-NT; ^b grupo HIV-NT \neq grupo HIV-TARV; ^c grupo controle \neq grupo HIV-TARV; ^d grupo HIV-NT \neq grupo HIV-TARV

\neq : diferente; **Controle:** indivíduos sem infecção pelo HIV; **HIV-NT:** indivíduos com infecção pelo HIV não tratados com terapia antirretroviral; **HIV-TARV:** indivíduos com infecção pelo HIV tratados com terapia antirretroviral; **HIV:** vírus da imunodeficiência humana

TABELA VI: Frequência de Diagnóstico e Uso de Medicamentos para Tratamento de Alterações Lipídicas e Perfil Lipídico para Grupos Controle (n=32), HIV-NT (n=28) e HIV-TARV (n=29) (adaptado de EIRA, 2009).

	Controle (n= 32)	HIV-NT (n= 28)	HIV-TARV (n= 29)	Valor de p
Diagnóstico prévio de alteração de colesterol	8 (25) ^a	11 (39,3) ^b	22 (75,9) ^{a,b}	<0,0001
Uso de medicamento para tratamento de hipercolesterolemia	7 (21,9) ^c	10 (35,7) ^d	21 (72,4) ^{c,d}	<0,0001
Diagnóstico final de alteração do colesterol	20 (62,5)	22 (78,6)	27 (93,1)	0,017
Diagnóstico final de hipertrigliceridemia	13 (40,6)	8 (28,6)	15 (51,7)	0,21
Diagnóstico final de dislipidemia	23 (71,9)	23 (82,1)	27 (93,1)	0,10
LDL-colesterol (mg/dL)	119,8 (28,4)	113,9 (31,2)	120,1 (27,2)	0,66
HDL-colesterol (mg/dL)	49,5 (15,2)	42,2 (9,2)	47,1 (10,5)	0,07
Triglicérides (mg/dL)	147,2 (87,3) ^e	137,3 (108,6) ^f	233,7 (193,4) ^{e,f}	0,02
Colesterol (mg/dL)*	198,8 (37,7)	181,6 (36,1)	208,8 (37,8)	---

Resultados apresentados como número de participantes (porcentagem) ou média (desvio-padrão). O diagnóstico de alteração de colesterol (hipercolesterolemia) foi definido como presença prévia de hipercolesterolemia confirmada por médico ou uso de medicamento para tratar hipercolesterolemia ou concentrações de LDL-colesterol ≥ 130 mg/dL ou HDL-colesterol ≤ 40 mg/dL. O diagnóstico de hipertrigliceridemia foi definido como concentrações de triglicérides ≥ 150 mg/dL. O diagnóstico de dislipidemia foi definido como presença de hipercolesterolemia ou hipertrigliceridemia confirmada.

* Valores obtidos a partir do banco de dados original do estudo.

^a grupo controle \neq grupo HIV-TARV; ^b grupo HIV-NT \neq grupo HIV-TARV; ^c grupo controle \neq grupo HIV-TARV; ^d grupo HIV-NT \neq grupo HIV-TARV; ^e grupo controle \neq grupo HIV-TARV; ^f grupo HIV-NT \neq grupo HIV-TARV

#: diferente; **Controle:** indivíduos sem infecção pelo HIV; **HDL:** lipoproteína de alta densidade; **HIV-NT:** indivíduos com infecção pelo HIV não tratados com terapia antirretroviral; **HIV-TARV:** indivíduos com infecção pelo HIV tratados com terapia antirretroviral; **HIV:** vírus da imunodeficiência humana; **LDL:** lipoproteína de baixa densidade

TABELA VII: Perfil Bioquímico para Grupos Controle (n=32), HIV-NT (n=28) e HIV-TARV (n=29) (adaptado de EIRA, 2009).

	Controle (n= 32)	HIV-NT (n= 28)	HIV-TARV (n= 29)	Valor de p
Creatinina (mg/dL)	0,89 (0,18)	0,91 (0,16)	0,96 (0,21)	0,09
Sódio (mEq/dL)	143,2 (3,0)	142,0 (2,4)	142,3 (1,5)	0,10
Potássio (mEq/dL)	4,2 (0,4)	4,2 (0,4)	4,2 (0,4)	0,89
Fósforo (mg/dL)	3,4 (0,5) ^a	3,7 (0,6) ^{a,b}	3,4 (0,5) ^b	0,045
Cálcio (mg/dL)	9,7 (0,4)	9,4 (0,4)	9,5 (0,3)	0,06
Ácido úrico (mg/dL)	5,6 (1,6)	6,2 (1,6)	5,5 (1,6)	0,17
Microalbuminúria (mg/L)	41,0 (51,5)	25,5 (29,4)	70,5 (256,6)	0,69

Resultados apresentados como média (desvio-padrão).

^a grupo controle \neq grupo HIV-NT; ^b grupo HIV-NT \neq grupo HIV-TARV

#: diferente; **Controle:** indivíduos sem infecção pelo HIV; **HIV-NT:** indivíduos com infecção pelo HIV não tratados com terapia antirretroviral; **HIV-TARV:** indivíduos com infecção pelo HIV tratados com terapia antirretroviral; **HIV:** vírus da imunodeficiência humana

TABELA VIII: Perfil Hematológico e Concentração de Proteína C Reativa Ultrassensível para Grupos Controle (n=32), HIV-NT (n=28) e HIV-TARV (n=29) (adaptado de EIRA, 2009).

	Controle (n= 32)	HIV-NT (n= 28)	HIV-TARV (n= 29)	Valor de p
Hemoglobina (g/dL)	14,2 (1,5)	13,8 (1,5)	14,3 (1,5)	0,31
Hematócrito (%)	43,5 (4,2)	42,6 (4,0)	43,7 (4,8)	0,58
Leucócitos (células/mm ³)	6828 (1783) ^a	5596 (1422) ^a	6817 (1805)	0,02
Plaquetas (células/mm ³)	242562 (55721)	220464 (55094)	231689 (56906)	0,32
PCR ultrassensível (mg/L)	2,2 (1,7)	3,3 (4,2)	2,6 (2,6)	0,39

Resultados apresentados como média (desvio-padrão).

^a grupo controle ≠ grupo HIV-NT

#: diferente; **Controle:** indivíduos sem infecção pelo HIV; **HIV-NT:** indivíduos com infecção pelo HIV não tratados com terapia antirretroviral; **HIV-TARV:** indivíduos com infecção pelo HIV tratados com terapia antirretroviral; **HIV:** vírus da imunodeficiência humana; **PCR:** proteína C reativa

TABELA IX: Concentração de CD4 e Carga Viral e Frequência de Sorologia Positiva para Hepatites B e C para Grupos HIV-NT (n=28) e HIV-TARV (n=29) (adaptado de EIRA, 2009).

	HIV-NT (n= 28)	HIV-TARV (n= 29)	Valor de p
Menor CD4 (células/ μ L)*	449 (176) ^a	208 (191) ^a	<0,0001
CD4 (células/ μ L)**	609 (307)	701 (400)	0,33
Carga viral máxima (cópias/mL)**	48690 (74621) ^b	169520 (205319) ^b	0,005
Carga viral (cópias/mL)**	13683 (25314) ^c	76 (61) ^c	0,005
Hepatite B	0 (0)	0 (0)	---
Hepatite C	0 (0)	1 (3,6)	0,33

Resultados apresentados como média (desvio-padrão) ou número de participantes (porcentagem).

* Menor CD4 corresponde a menor concentração de CD4, desde o momento do diagnóstico inicial de infecção pelo HIV/aids; ** Valores obtidos no momento da seleção dos indivíduos para participação no estudo; *** Carga viral máxima corresponde ao maior resultado obtido, desde o momento do diagnóstico inicial de infecção pelo HIV/aids

^a grupo HIV-NT ≠ grupo HIV-TARV; ^b grupo HIV-NT ≠ grupo HIV-TARV; ^c grupo HIV-NT ≠ grupo HIV-TARV

#: diferente; **aids:** síndrome da imunodeficiência adquirida; **CD4:** contagem de linfócitos T CD4 positivo; **HIV-NT:** indivíduos com infecção pelo HIV não tratados com terapia antirretroviral; **HIV-TARV:** indivíduos com infecção pelo HIV tratados com terapia antirretroviral; **HIV:** vírus da imunodeficiência humana

TABELA X: Avaliação da Espessura Média-Íntima das Carótidas Direita e Esquerda para Grupos Controle (n=32), HIV-NT (n=28) e HIV-TARV (n=29) (adaptado de EIRA, 2009).

	Controle (n= 32)	HIV-NT (n= 28)	HIV-TARV (n= 29)	Valor de p
Espessura de carótida direita (mm)	0,50 (0,16)	0,53 (0,15)	0,51 (0,11)	0,83
Espessura de carótida esquerda (mm)	0,54 (0,18)	0,49 (0,10)	0,62 (0,37)	0,15
Presença de aterosclerose à direita	3 (9,4)	2 (7,1)	5 (17,2)	0,44
Presença de aterosclerose à esquerda	3 (9,4)	4 (14,3)	5 (17,2)	0,66

Resultados apresentados como média (desvio-padrão) ou número de participantes (porcentagem).

Controle: indivíduos sem infecção pelo HIV; **HIV-NT:** indivíduos com infecção pelo HIV não tratados com terapia antirretroviral; **HIV-TARV:** indivíduos com infecção pelo HIV tratados com terapia antirretroviral; **HIV:** vírus da imunodeficiência humana

TABELA XI: Velocidade de Onda de Pulso para Grupos Controle (n=32), HIV-NT (n=28) e HIV-TARV (n=29) (adaptado de EIRA, 2009).

	Controle (n= 32)	HIV-NT (n= 28)	HIV-TARV (n= 29)	Valor de p
Velocidade de onda de pulso, sem ajustes (m/seg)	8,7 (1,4) ^a	8,8 (1,5)	9,7 (1,8) ^a	0,03
Velocidade de onda de pulso, ajustada para idade (m/seg)	8,9 (0,3)*	9,1 (0,3)*	9,8 (0,3)*	<0,0001
Velocidade de onda de pulso, ajustada para idade e pressão arterial sistólica (m/seg)	8,9 (0,2)*	9,2 (0,3)*	9,7 (0,3)*	<0,0001

Resultados apresentados como média (desvio-padrão) ou média (erro-padrão), sinalizado com *.

^a grupo controle ≠ grupo HIV-TARV

Controle: indivíduos sem infecção pelo HIV; **HIV-NT:** indivíduos com infecção pelo HIV não tratados com terapia antirretroviral; **HIV-TARV:** indivíduos com infecção pelo HIV tratados com terapia antirretroviral; **HIV:** vírus da imunodeficiência humana

TABELA XII: Escore de Risco de Framingham para Participantes dos Grupos Controle (n=32), HIV-NT (n=28) e HIV-TARV (n=29) (adaptado de EIRA, 2009).

	Controle (n= 32)	HIV-NT (n= 28)	HIV-TARV (n= 29)	Valor de p
Risco baixo	32 (100) ^a	27 (96,4)	19 (65,5) ^a	0,04
Risco moderado	0 (0)	1 (3,6)	2 (6,9)	0,43
Risco alto	0 (0) ^b	0 (0) ^{b,c}	8 (27,6) ^c	0,0001

Resultados apresentados como número de participantes (porcentagem). O risco baixo foi definido como risco em 10 anos de doença cardíaca isquêmica <10%. O risco moderado foi definido como risco em 10 anos de doença cardíaca isquêmica >10% e <20%. O risco alto foi definido como risco em 10 anos de doença cardíaca isquêmica ≥20%.

^a grupo controle ≠ grupo HIV-TARV; ^b grupo controle ≠ grupo HIV-NT; ^c grupo HIV-NT ≠ grupo HIV-TARV

#: diferente; **Controle:** indivíduos sem infecção pelo HIV; **HIV-NT:** indivíduos com infecção pelo HIV não tratados com terapia antirretroviral; **HIV-TARV:** indivíduos com infecção pelo HIV tratados com terapia antirretroviral; **HIV:** vírus da imunodeficiência humana

TABELA XIII: Frequência de Síndrome Metabólica para Participantes dos Grupos Controle (n=32), HIV-NT (n=28) e HIV-TARV (n=29) (adaptado de EIRA, 2009).

	Controle (n= 32)	HIV-NT (n= 28)	HIV-TARV (n= 29)	Valor de p
Síndrome metabólica	9 (28,1) ^a	7 (25,0) ^b	12 (41,4) ^{a,b}	0,0001

Resultados apresentados como número de participantes (porcentagem).

^a grupo controle ≠ grupo HIV-TARV; ^b grupo HIV-NT ≠ grupo HIV-TARV

#: diferente; **Controle:** indivíduos sem infecção pelo HIV; **HIV-NT:** indivíduos com infecção pelo HIV não tratados com terapia antirretroviral; **HIV-TARV:** indivíduos com infecção pelo HIV tratados com terapia antirretroviral; **HIV:** vírus da imunodeficiência humana